

Título de la Tesis

Estudio comparativo de los efectos de la Inyección Intramiocárdica de Células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea, Células Mesenquimales derivadas de Médula Ósea y Células Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo sobre la Recuperación Funcional y Morfoestructural del Tejido Cardíaco en un Modelo Murino de Miocardiopatía Dilatada.

Thesis title

Comparative study of intramyocardial injection effects of bone marrow-derived mononuclear cells, bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional and morphostructural recovery of cardiac tissue in a rat model of dilated cardiomyopathy.

Memoria presentada por la doctoranda

María Dolores Carmona Luque

Para optar al grado de

Doctora en Biomedicina por la Universidad de Córdoba

Tesis realizada bajo la dirección de las doctoras

Concepción Herrera Arroyo y Sonia Nogueras Martín.

Unidad de Terapia Celular, Servicio de Hematología.

Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Programa de Doctorado de Biomedicina

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología.

Facultad de Ciencias.

Córdoba, 15 de Diciembre de 2017.

TITULO: *Estudio comparativo de los efectos de la Inyección Intramiocárdica de Células Mononucleadas derivadas de Médula Osea, Células Mesenquimales derivadas de Médula Osea y Células Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo sobre la Recuperación Funcional y Morfoestructural del Tejido Cardíaco en un Modelo Murino de Miocardiopatía Dilatada*

AUTOR: *María Dolores Carmona Luque*

© Edita: UCOPress. 2018
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es

**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE CÓRDOBA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA DE CÓRDOBA



Título de la tesis doctoral.

Estudio comparativo de los efectos de la Inyección Intramiocárdica de Células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea, Células Mesenquimales derivadas de Médula Ósea y Células Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo sobre la Recuperación Funcional y Morfoestructural del Tejido Cardíaco en un Modelo Murino de Miocardiopatía Dilatada

Autora.

Lcda. María Dolores Carmona Luque.

Directoras.

Dra. Inmaculada Concepción Herrera Arroyo.

Dra. Sonia Nogueras Martín.

Córdoba, 15 de Diciembre de 2017.



TÍTULO DE LA TESIS.

Estudio comparativo de los efectos de la Inyección Intramiocárdica de Células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea, Células Mesenquimales derivadas de Médula Ósea y Células Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo sobre la Recuperación Funcional y Morfoestructural del Tejido Cardíaco en un Modelo Murino de Miocardiopatía Dilatada.

DOCTORANDA.

María Dolores Carmona Luque

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Doña INMACULADA CONCEPCIÓN HERRERA ARROYO, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad de Córdoba y Doña SONIA NOGUERAS MARTÍN, Doctora en Biología por la Universidad de Córdoba,

CERTIFICAN

Que Doña MARÍA DOLORES CARMONA LUQUE, Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Córdoba, ha realizado bajo su dirección en el Hospital Universitario Reina Sofía el trabajo titulado *"Estudio comparativo de los efectos de la Inyección Intramiocárdica de Células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea, Células Mesenquimales derivadas de Médula Ósea y Células Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo sobre la Recuperación Funcional y Morfoestructural del Tejido Cardíaco en un Modelo Murino de Miocardiopatía Dilatada"*, habiendo generado publicaciones en revistas de impacto y realizando una formación académica de nivel correspondiente al grado de doctor al que opta la doctoranda.

El trabajo tiene calidad suficiente para ser defendido como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 15 de Diciembre de 2017.

Firma del/de los director/es

Fdo., 



Fdo., _____

Agradecimientos

Ahora que ha finalizado este largo camino que he recorrido de intenso trabajo, estudio y gran esfuerzo hasta la finalización de mi tesis doctoral me doy cuenta que habría sido muy difícil, por no decir imposible, lograr este gran objetivo personal y profesional sin el apoyo incondicional de todas esas personas que han confiado en mí desde el principio, y me han animado ofreciéndome todo su apoyo.

En primer lugar quisiera agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Concha Herrera, la supervisión y tutela de mi trabajo de tesis. Gracias por tu continuo apoyo, desde el principio, tu gran paciencia y por todos los conocimientos que me has transmitido. Sin todo ello no habría sido posible conseguir este gran proyecto personal, mi tesis doctoral ni desarrollar mi carrera profesional, vocacional desde el principio.

En segundo lugar, pero no por ello menos importante, quiero agradecer a la Dra. Sonia Nogueras, codirectora de tesis, su gran compañerismo y todas sus enseñanzas. Son muchas las horas que hemos compartido juntas construyendo este gran proyecto que hoy es mi tesis doctoral. Estas horas se las he robado a su vida personal y por eso es sincero e infinito el agradecimiento a la persona que hoy es una gran amiga. GRACIAS por estar siempre a mi lado y por todas esas palabras de aliento.

Al Dr. Miguel Romero por confiar en este trabajo de tesis y trasladar su gran conocimiento en Cardiología Humana hasta el corazón de mis ratas. Gracias por guiar este trabajo y por el ánimo recibido hasta la conclusión del mismo.

Al Dr. Alfonso Blanco, un gran maestro en Anatomía Patológica, en Microscopía y en la Vida. Alma insaciable de conocimiento y un ejemplo para mí por ser fuente inagotable de sabiduría.

A todas mis compañeras de la Unidad de Terapia Celular que han compartido conmigo tantos años de intenso trabajo y por su gran compañerismo.

Hay un agradecimiento que sale de lo más profundo de mi corazón y es el que va dirigido a mis padres. A mi madre, quien tantas veces me ha preguntado si no me cansaba de estudiar. Siempre ha tenido esas palabras justas en el momento que más las he necesitado y me han dado el empujoncito para terminar los proyectos iniciados. Y a mi padre, entusiasmado siempre con todos mis entusiasmos y soñador de todos mis sueños. De ellos he aprendido que en esta vida todo lo que se desea de verdad conseguir, si se lucha, se hace realidad. Gracias de corazón.

Para el final he querido dejar este agradecimiento que va dirigido a la persona que desde el principio creyó en mí y en mi proyecto, llenándolo de admiración y entusiasmo. Gracias Juan por tu comprensión, por tu infinita paciencia y sobre todo por tu apoyo incondicional y tu ánimo que me han acompañado hasta alcanzar esta gran meta personal. Gracias por enseñarme a ver lo evidente.

Ahora comienza un nuevo proyecto para los dos que está en la línea de salida.

Pero ese lo escribiremos juntos.....

Índice

| | |
|---|-----------|
| Índice | 1 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 15 |
| Glosario de Términos | 21 |
| Introducción | 27 |
| 1.-Terapia Celular y Medicina Regenerativa | 29 |
| 1.1.-Revisión histórica | 29 |
| 1.2.-Células troncales | 36 |
| 1.2.1.-Definición | 36 |
| 1.2.2.-Clasificación | 36 |
| 2.-Terapia Celular y Miocardiopatía Dilatada | 42 |
| 2.1.-Terapia Celular en Cardiología | 42 |
| 2.2.-Mecanismos de reparación del daño cardíaco | 46 |
| 2.3.-Miocardiopatía Dilatada | 49 |
| 2.4.-Desarrollo de la investigación preclínica en Terapia Celular aplicada a la Miocardiopatía Dilatada | 53 |
| Justificación | 61 |
| Hipótesis | 67 |
| Objetivos | 71 |

| | |
|---|-----------|
| Material y Métodos | 75 |
| 1.-Diseño experimental | 77 |
| 2.-Caracterización del producto celular: Estudio <i>in vitro</i> | 80 |
| 2.1.-Aislamiento de células mononucleadas procedentes de ratas Wistar sanas donantes..... | 80 |
| 2.2.-Aislamiento y expansión de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo procedentes de ratas Wistar sanas donantes..... | 81 |
| 2.3.-Aislamiento y expansión de células mesenquimales derivadas de médula ósea procedentes de ratas Wistar sanas donantes..... | 83 |
| 2.4.-Caracterización fenotípica por citometría de flujo de células mononucleadas y células mesenquimales..... | 84 |
| 2.5.-Caracterización funcional de células mesenquimales..... | 85 |
| 2.5.1.-Diferenciación adipogénica..... | 86 |
| 2.5.2.-Diferenciación osteogénica..... | 87 |
| 2.5.3.-Diferenciación condrogénica..... | 88 |
| 2.6.-Caracterización morfológica de células mononucleadas y células mesenquimales..... | 89 |
| 2.6.1.-Caracterización por microscopía electrónica de transmisión..... | 90 |
| 2.6.2.-Caracterización por microscopía electrónica de barrido..... | 90 |
| 2.7.-Cuantificación de factores solubles secretados por las células mesenquimales..... | 91 |
| 2.7.1.-Factor derivado del endotelio vascular tipo A..... | 93 |

| | |
|--|------------|
| 2.7.2.- Factor de crecimiento transformante tipo $\beta 1$ | 95 |
| 2.7.3.- Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2..... | 96 |
| 2.8.-Determinación de la tasa de duplicación de cada población de MSCs..... | 98 |
| 3.-Desarrollo experimental del modelo murino de Miocardiopatía | |
| Dilatada..... | 99 |
| 3.1.-Inducción de la Miocardiopatía Dilatada..... | 99 |
| 3.2.-Administración de la terapia celular..... | 101 |
| 3.3.-Sacrificio y obtención de tejido cardíaco..... | 105 |
| 4.-Análisis experimentales..... | 107 |
| 4.1.-Funcionalidad cardíaca por ecocardiografía..... | 107 |
| 4.2.-Factores fisiológicos..... | 109 |
| 4.3.-Factores solubles en suero | 110 |
| 4.3.1.-Factor de crecimiento del endotelio vascular..... | 110 |
| 4.3.2.-Péptido natriurético atrial tipo B..... | 111 |
| 5.-Análisis morfo-histológico del tejido cardíaco..... | 113 |
| 5.1.-Procesamiento de muestras de tejido cardíaco..... | 113 |
| 5.2.-Análisis morfo-estructural: Tinción Hematoxilina-Eosina..... | 114 |
| 5.3.-Análisis morfométrico de la fibrosis cardíaca: | |
| Tinción con tricrómico de Masson..... | 115 |
| 5.4.-Análisis inmunohistoquímico de neovascularización | |
| del tejido cardíaco: Tinción con α -SMA..... | 116 |
| 5.5.-Análisis ultraestructural del tejido miocárdico | |
| por microscopía electrónica de transmisión..... | 118 |

| | |
|---|------------|
| 6.-Análisis estadístico | 120 |
| Resultados | 121 |
| 1.-Caracterización del producto celular | 123 |
| 1.1.-Células mononucleadas derivadas de médula ósea | 123 |
| 1.1.1.-Caracterización fenotípica | 123 |
| 1.1.2.-Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión | 125 |
| 1.2.-Células mesenquimales derivadas de médula ósea y de tejido adiposo | 130 |
| 1.2.1.-Caracterización fenotípica | 130 |
| 1.2.2.-Caracterización funcional | 134 |
| 1.2.2.1.-Diferenciación adipogénica | 134 |
| 1.2.2.2.-Diferenciación osteogénica | 135 |
| 1.2.2.3.-Diferenciación condrogénica | 137 |
| 1.2.3.-Caracterización morfológica | 140 |
| 1.2.3.1.-Por microscopía electrónica de barrido | 141 |
| 1.2.3.2.-Por microscopía electrónica de transmisión | 143 |
| 1.2.4.-Cuantificación de secreción de factores solubles | 147 |
| 1.2.4.1.-Factor derivado del endotelio vascular | 147 |
| 1.2.4.2.-Factor de crecimiento transformante tipo $\beta 1$ | 149 |
| 1.2.4.3.- Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 | 151 |
| 1.2.5.-Tasa de duplicación de cada población de células mesenquimales | 152 |
| 2.-Resultados del desarrollo del modelo experimental murino de Miocardiopatía Dilatada | 155 |
| 2.1.-Modelo experimental | 155 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.-Análisis de la funcionalidad cardiaca..... | 156 |
| 2.3.-Análisis de los factores fisiológicos | 162 |
| 2.4.-Análisis de los factores séricos cuantificados..... | 164 |
| 2.4.1.-Factor derivado del endotelio vascular..... | 164 |
| 2.4.2.-Péptido natriurético atrial tipo B | 166 |
| 2.5.-Análisis histológico del tejido cardiaco..... | 168 |
| 2.6.-Análisis morfométrico de la fibrosis cardiaca..... | 173 |
| 2.7.-Análisis inmunohistoquímico de neovascularización del tejido cardiaco..... | 174 |
| 2.8.-Análisis ultraestructural del tejido miocárdico..... | 178 |
| Discusión..... | 185 |
| Conclusiones..... | 199 |
| Bibliografía..... | 203 |
| Anexo I..... | 221 |

Resumen

Antecedentes

Uno de los campos de Medicina Regenerativa que más expectativas ha creado dentro de la terapia celular ha sido su aplicación en Cardiología.

Los efectos de la terapia celular sobre la Miocardiopatía Dilatada han sido investigados en modelos preclínicos en los que el tipo celular administrado ha sido diferente en cada estudio.

A pesar del gran número de estudios preclínicos realizados, de la extensa variedad de modelos animales de MCD diseñados, de los tipos celulares y dosis administradas, de las vías de administración utilizadas, de los tiempos de evaluación considerados y de los parámetros seleccionados para la determinación del grado de recuperación de la MCD, resulta necesario el diseño de un estudio que incluya criterios de evaluación comunes y permita realizar un análisis comparativo de la eficacia de los distintos tratamientos celulares administrados en la recuperación del daño causado por la MCD.

El conocimiento generado a partir de estos resultados podría ser trasladado a la práctica clínica, objetivo principal de la Investigación Biomédica Traslacional.

Objetivos

El objetivo principal del presente estudio consiste en comparar *in vivo* los efectos de la inyección intramiocárdica de células mononucleadas derivadas de médula ósea (CMNs), de células mesenquimales derivadas de médula ósea (MSCsMO) y de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSCsTA) sobre la recuperación

funcional y morfoestructural del tejido cardiaco dañado por la MCD inducida en un modelo murino autólogo.

Material y Métodos

Se ha desarrollado una primera fase *in vitro* en la que se han caracterizado morfológicamente por microscopía electrónica y fenotípicamente por citometría de flujo los tres tipos celulares seleccionados en este estudio: CMNs, MSCsMO y MSCsTA.

Las MSCs han sido además caracterizadas funcionalmente mediante la determinación del potencial de diferenciación adipogénico, osteogénico y condrogénico y de la cuantificación del factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A (VEGF-A), del factor de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGF-2) y del factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) secretados al medio de cultivo. A partir de esta caracterización han sido seleccionados los pases de cada población de MSCs con características morfo-funcionales más homogéneas para ser administradas como tratamiento en la fase *in vivo* del estudio.

En esta segunda fase *in vivo* se han comparado los efectos de la inyección intramiocárdica de CMNs, de MSCsMO y de MSCsTA en la recuperación de la función cardiaca y en la reorganización, tanto a nivel histológico como ultraestructural, del tejido cardiaco dañado en un modelo de MCD en rata.

Para este estudio se han utilizado ratas Wistar isogénicas, unas como donantes de los diferentes tipos celulares y otras como receptoras de dichas células administradas como tratamiento de la MCD autoinmune inducida, emulando un modelo de trasplante autólogo.

Todos los animales incluidos en el estudio fueron randomizados en cuatro grupos el día 0: Grupo placebo, grupo CMNs, grupo MSCsTA y grupo MSCsMO. Los diferentes tratamientos fueron administrados por vía intramiocárdica el día +42 del

estudio. Se han realizado ecocardiografías seriadas para evaluar la función cardíaca el día 0, +42 y +70 del estudio.

Los corazones obtenidos tras el sacrificio de todos los animales, día +70, fueron procesados para el análisis histológico y ultraestructural del tejido cardíaco. Los niveles séricos del péptido natriurético tipo B (BNP) han sido cuantificados en los días 0, +42 y +70 del estudio, y los del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) los días 0, +42, +43 y +70 del estudio.

Resultados

Respecto a la caracterización *in vitro* de la población de CMNs, en el análisis fenotípico de las distintas alícuotas se observó que los marcadores *CD34* y *CD117* se presentaron en menos del 10% de la población, el marcador *CD45* en más del 50% y el marcador *CD133* en menos del 1% de la población de CMNs analizadas. A nivel ultraestructural, todas las alícuotas de CMNs analizadas fueron morfológicamente similares, con características intracelulares normales y constituidas por dos subpoblaciones principales: monocitos y linfocitos.

Respecto al estudio *in vitro* realizado a la población de MSCsMO y de MSCsTA, se determinó que los pases de cultivo que presentaron un fenotipo verdadero de célula mesenquimal fueron los pases 2 y 5 para la población de MSCsMO, y los pases 2, 3, 4 y 5 para la población MSCsTA. Respecto a la capacidad de diferenciación a las tres principales líneas mesodérmicas, se observó que la población de MSCsMO presentaba máxima capacidad de diferenciación a adipocitos y osteocitos en pase 2 de cultivo mientras que la población de MSCsTA la presentó en pase 5. La capacidad de diferenciación a la línea condrocítica fue muy similar en las dos poblaciones siendo máxima en ambos casos en los pases 4 y 5. A nivel ultraestructural, el análisis de las poblaciones seleccionadas para ser administradas como tratamiento en el estudio *in vivo*, MSCsMOp2 y MSCsTAp5, mostró que ambas eran morfológicamente similares, con características intracelulares normales.

En la cuantificación de los factores secretados por las MSCs a lo largo de los diferentes pases de cultivo se demostró que, independientemente del origen medular o adiposo, las MSCs expandidas *in vitro* poseen una capacidad de secreción de VEGF, TGF- β 1 y FGF_b muy similar en todos los pases de cultivo, sin diferencias significativas entre ellas.

En el estudio *in vivo* realizado se observó que las MSCsMO mejoraron significativamente todos los parámetros de función ventricular excepto los relacionados con las dimensiones cardíacas en fase diastólica. Además, en los animales tratados con MSCsTA se observó un incremento final de la fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo (VI) y la fracción de acortamiento (FA) superior al observado en los animales tratados con CMNs o placebo. Sin embargo esta mejoría final observada el día +70 no resultó significativa respecto a sus propios valores observados el día +42, punto de máximo daño.

Respecto al examen histológico, las diferencias observadas entre los grupos tratados concordaron con los resultados obtenidos en la recuperación de la función cardíaca final. Así las muestras de tejido cardíaco procedentes de ratas tratadas con MSCsMO mostraron abundantes fibras cardíacas morfológicamente normales, en contraste con la elevada presencia de fibras en estadio necrótico observadas en el tejido cardíaco procedente del grupo tratado con placebo. Las muestras derivadas de los animales tratados con MSCsTA o CMNs mostraron niveles intermedios de daño.

El análisis de la ultraestructura de las fibras cardíacas confirmó los resultados histológicos previamente descritos.

Respecto al análisis cuantitativo de las fibras de colágeno, el tejido cardíaco procedente de animales tratados con MSCsTA presentaba un porcentaje de fibras de colágeno muy elevado y similar al del grupo control. Los animales tratados con CMNs mostraron un porcentaje de fibras de colágeno significativamente inferior al obtenido en el grupo control y los tratados con MSCsMO mostraron una reducción aún mayor.

En el análisis de la microvasculatura del miocardio, el recuento de pequeños vasos por cada campo de alta resolución analizado resultó significativamente mayor en

el grupo de animales tratados con MSCs respecto al recuento obtenido en el grupo tratado con CMNs y en el placebo.

La concentración sérica de VEGF presentó un pico significativo en el grupo tratado con CMNs en las primeras 24 horas tras la administración del tratamiento, día +43, no mantenido a lo largo del tiempo. Sin embargo la inyección de los dos tipos de MSCs produjo niveles persistentemente elevados de VEGF hasta el día +70, final del estudio.

La concentración sérica final de BNP resultante en los grupos de animales tratados con MSCs fue más reducida que la obtenida en los grupos control y CMNs, resultando además esta reducción significativa en el grupo tratado con MSCsMO.

Conclusiones

El presente estudio demuestra que la inyección intramiocárdica de MSCs derivadas de MO y de TA posee un efecto más beneficioso sobre la recuperación funcional cardíaca y la neovascularización que la inyección de CMNs en un modelo de MCD desarrollado en rata. Además, las MSCsMO poseen un mayor efecto antifibrótico y de remodelado de las fibras cardíacas que los otros tipos celulares administrados, incluidas las MSCsTA.

Abstract

Background

Application of Cell Therapy in heart failure has generated high expectations in Regenerative Medicine.

Effects of cell therapy on dilated cardiomyopathy (DCM) have been investigated in preclinical models using distinct cellular types in each study. However, the large heterogeneity regarding the animal models, the cell types and the cell doses, the administration route and the study end-points selected, makes it difficult to obtain a robust conclusion about which cell type and in which culture passage, if any, is the most effective in improving damaged cardiac function due to DCM. So, it is necessary to design a single study that compares the effectiveness of different cell types administration in improving damaged cardiac function due to DCM. The knowledge generated from these results could be transferred to clinical practice, main goal of Translational Biomedical Research.

Objective

The aim of the present work was to compare the effects of intramyocardial injection of Bone Marrow (BM)-Mononuclear Cells (MNCs), BM-Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Adipose Tissue (AT)-MSCs on heart function, histological organization and myocardial ultrastructure in a model of DCM in rats.

Material and Methods

In a first *in vitro* phase, BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs were characterized morphologically by electron microscopy and phenotypically by flow

cytometry. Furthermore, MSCs were functionally characterized through the assesment of adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiaton capacity and the quantification of secreted factors to the culture medium. From these characterizations, the most homogeneous culture passage from each cell population was selected to be injected as MCD treatment

In a second *in vivo* phase, it was compared the effects of intramyocardial injection of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs on heart function recovery, on histological reorganization and myocardial ultrastructure in a rat model of DCM. Isogenic Wistar rats were used to isolate the different cell types and to induce DCM by autoimmune myocarditis. Animals, on day 0, were randomly assigned to receive BM-MNCs, BM-MSCs, AT-MSCs or placebo. The different treatments were administered at day 42 by intramyocardial injection. Serial echocardiography was used to assess cardiac function and hearts obtained after sacrifice, at day 70, were used for histological and ultrastructural analysis. Serum levels of Type B-Natriuretic Peptide (BNP) were quantified on day 0, +42 and +70 and Vascular Endothelial Growth-Factor (VEGF) serum levels on days 0, +42, +43 and +70.

Results

Respect to phenotype characterization, BM-MNCs population expressed CD34 and CD117 markers in less than 10% of population, CD45 marker in more than 50% of population and CD133 marker in less than 1% of population analized, in the phenotypic assesment.

At ultrastructural level, BM-MNCs showed normal intracelular characteristics. Two cell subpopulations were clearly distinguished: monocytes and lymphocytes.

Respect to phenotype characterization of MSCs, it was observed that BM-derived cells showed typical phenotype of mesenchymal cell in passages 2 and 5, and AT-derived cells showed it in passages 2, 3, 4 y 5.

The maximum adipogenic and osteogenic differentiation capacity were observed in passage 2 for BM-MSCs and in passage 5 for AT-MSCs. The chondrogenic differentiation capacity was similar in both MSCs populations.

At ultrastructural level, BM-MSCs in passage 2 and AT-MSCs in passage 5 showed similar intracellular characteristics.

MSCs derived from BM and AT showed similar secretion capacity of VEGF, TGF- β 1 and FGF_b in all passage culture, without significant differences.

Regarding to *in vivo* study, echocardiographic analysis demonstrated that BM-MSCs were able to improve every parameter of the cardiac function except those of diastolic dimensions. Moreover AT-MSC treated group reach a more slight improvement in ejection fractions (EF) and fractional shortening (FS) than BM-MNCs and placebo treated groups. Although this final improvement observed on day +70 were non-significant respect to pre-treatment values at day +42.

Histological exam of hearts tissue showed differences between groups concordated with cardiac function recovery results. Though, heart sections from BM-MSC treated rats showed mainly normal cardiac fibers in strong contrast with control group that exhibited mostly degenerative necrotic cardiac fibers. Hearts from AT-MSC and BM-MNC treated animals showed an intermediate level of damage between that observed in controls and in animals treated with BM-MSCs.

The ultrastructure analysis seems to corroborate the histological findings.

The quantitative analysis of collagen fibers included in cardiac tissue demonstrated that AT-MSC treated animals had a higher percentage of collagen, similar to controls. BM-MNC treated group showed a significant reduction of fibrosis in comparison to controls. This reduction was even more evident in animals treated with BM-MSCs.

Regarding the myocardial microvasculature, the number of small vessels per high power field analyzed was significantly higher in hearts of animals treated with MSCs than in those treated with BM-MNCs and controls.

VEGF serum concentration showed a significantly higher peak at the first 24 hours after BM-MNCs injection but these levels were not maintained on the time. Although

the injection of MSCs maintained increased VEGF serum levels during four weeks after cell injection, until the animals sacrifice on day +70.

Final BNP serum levels in controls and in BM-MNCs treated animals remain significantly higher than BNP levels observed in BM-MSCs, but not in AT-MSCs treated animals.

Conclusion

The present study demonstrate that intramyocardial injection of MSCs derived from BM and AT improves left ventricular function and induces more neovascularization than BM-MNCs in a DCM rat model. In addition, BM-MSCs have much better antifibrotic effects and more ability to reorganize myocardial tissue compared to the other cell types. This improvement correlates with changes at the histological and ultrastructural levels.

Glosario de Términos

| | |
|------------------|--|
| APC | Aloficocianina |
| BNP | Péptido natriurético atrial-tipo B |
| CE | Células de carcinoma embrionario |
| CMNs | Células mononucleadas |
| CSCs | Células troncales cardíacas residentes |
| DE | Desviación estándar |
| DFD | Diámetro final diastólico |
| DFS | Diámetro final sistólico |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas |
| EPCs | Células progenitoras endoteliales |
| ESCs | Células madre embrionarias pluripotenciales |
| FA | Fracción de acortamiento |
| FBS | Suero fetal bovino |
| FE | Fracción de eyección |
| FGF _b | Factor de crecimiento derivado de fibroblastos-tipo b |
| FGF-2 | Factor de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 |
| FITC | Isocianato de fluoresceína |
| FSC | Tamaño población celular |
| HIF-1 α | Factor inducible de hipoxia-1 α |
| H/E | Hematoxilina/eosina |
| HPF | Campos de alta resolución |
| HSCs | Células hematopoyéticas |
| HURS | Hospital Universitario Reina Sofía |
| IL-4 | Interleuquina 4 |
| IM | Intramiocárdica |
| IMIBIC | Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba |
| INH | Inhalatoria |
| IP | Intraperitoneal |
| iPSCs | Células madre pluripotentes inducidas |
| IV | Intravenosa |

| | |
|----------------|---|
| KCl | Cloruro potásico |
| MAPCs | Células progenitoras multipotenciales adultas |
| MCD | Miocardiopatía dilatada |
| MO | Médula ósea |
| MSCs | Células mesenquimales del estroma |
| MSCsMO | Células mesenquimales derivadas de MO |
| MSCsMOp2 | MSCsMO en pase 2 de cultivo |
| MSCsTA | Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo |
| MSCsTAp5 | MSCsTA en pase 5 de cultivo |
| NK | Células citotóxicas o natural killer |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| Pc | Peso corporal |
| PCo | Peso del corazón |
| PD | Tasa de duplicación de la población celular |
| PE | Ficoeritrina |
| SCAI | Servicio Central de Apoyo a la Investigación |
| SF | Suero fisiológico |
| SP | Sangre periférica |
| SPs | Side population cells |
| SSC | Complejidad granular citoplasmática |
| TA | Tejido adiposo |
| TCSCs | Células troncales comprometidas con el tejido |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformante- β |
| TGF- β 1 | Factor de crecimiento transformante- β 1 |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral- α |
| TNS | Solución neutralizante |
| TSG-6 | Factor de necrosis tumoral-6 |
| VEGF | Factor de crecimiento del endotelio vascular |
| VEGF-A | Factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A |
| VFD | Volumen final diastólico |
| VFS | Volumen final sistólico |

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| VI | Ventrículo izquierdo |
| VSEs | Células troncales embrionarias-like |
| α -SMA | α -Actina de músculo liso |
| α -MEM | Medio esencial mínimo- α |

Introducción

1.-TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA

El avance producido en los últimos años en el conocimiento de la Biología Celular de las células madre, o células troncales, ha permitido su aplicación como tratamiento de diversas enfermedades, demostrándose su capacidad para la recuperación del tejido dañado en el cual son trasplantadas.

1.1.-REVISIÓN HISTÓRICA

El término “*Medicina Regenerativa*” fue acuñado por primera vez en el año 2004 por el Dr. William Haseltine. A partir de entonces ha sido considerada como área emergente y multidisciplinar de la Biomedicina ¹.

La Medicina Regenerativa está integrada tanto por la investigación básica como por la clínica y está enfocada hacia la reparación y regeneración de células, tejidos y órganos dañados como consecuencia de enfermedades, defectos congénitos, trauma y/o envejecimiento. Abarca áreas tan diversas como la Biología del Desarrollo y la Biología Química, la Terapia Celular y Génica, la Ingeniería de Tejidos, la Nanociencia y la Bioingeniería ¹.

La regeneración de tejidos y órganos no es un concepto nuevo. Ya en el siglo VIII a. C., Hesíodo describe en su Teogonía el mito del gran Titán en el que narra cómo Prometeo, tras robar el fuego, fue castigado por Júpiter a ser encadenado y su hígado ser extirpado por un águila llamada Ethon todos los días durante los 30.000 años que duró el castigo, regenerándose su hígado todas las noches hasta que fue liberado por Hércules. En este mito observamos cómo los antiguos griegos ya eran

conscientes de la capacidad de regeneración del hígado al que llamaron inicialmente “hepar” (del griego *hēpar*: ἥπαρ) o “hē-paomai” (en griego: *ηπάομαι*) que significa “reparar uno mismo”.

Más tarde, en el siglo IV a. C., Aristóteles (384 a. C.-322 a. C.) en su obra “*Historia Natural*”² afirmó que los animales poseían un mayor potencial de regeneración durante las primeras etapas de su desarrollo. Para demostrarlo describió detalladamente el proceso de regeneración de las extremidades de la salamandra y de las astas de los ciervos.

Varios siglos después, y continuando con la eterna búsqueda del hombre por el reemplazo de tejidos dañados, encontramos “*El milagro del trasplante de la pierna negra*”³, descrito por el dominico italiano Santiago de la Vorágine (1230-1298), en el cual se narra la historia de un devoto hombre a quien los santos mártires Cosme y Damián le trasplantaron, mientras dormía, su pierna gangrenada por la de una persona difunta de raza negra.

Continuando con el análisis de la Historia de la Regeneración, la primera teoría que se fue postulada sobre el mecanismo de regeneración que se producía en tejidos y órganos se denominó “*Teoría Preformista*”. Esta teoría, ya defendida por Demócrito en la antigua Grecia, sobre el siglo IV a. C., afirmaba que los organismos y apéndices al nacer o al ser regenerados preexisten como miniaturas en el sitio de interés. Esta teoría, que se mantuvo durante siglos, tuvo su mayor auge entre la segunda mitad del siglo XVII y primera mitad del siglo XVIII, momento en el que surgió la “*Teoría de la Epigénesis*” de origen aristotélico según la cual “*la forma biológica ordenada se origina a partir de la materia indiferenciada amorfa que por un proceso de ordenamiento es capaz de dar vida*”⁴. A finales del siglo XVIII la epigénesis ganó aceptación sobre el preformismo provocando una auténtica revolución en las ciencias naturales.

Con el desarrollo del conocimiento de la biología de los tejidos, en el año 1839 el botánico Jakob Schleiden (1804-1881) y el zoólogo Theodor Schwann (1810-1882) definieron la “*Teoría Celular*”, soporte fundamental de la actual Biología Celular. Según esta teoría los seres vivos son células o están formados por ellas, considerando la célula como la unidad básica estructural, funcional y principal de la vida.

En 1858, el patólogo Rudolf L. K. Virchow (1821-1902) confirmó esta teoría afirmando que “*omnis cellula e cellula*”(Toda célula procede de otra célula) y estableció la idea de que las células son las unidades elementales de la vida capaces de replicarse por división ^{5,6}.

Contribuyendo a esta teoría, en el año 1867 el patólogo alemán Julius Cohnheim (1839-1884) postuló la “*Hipótesis de Cohnheim*” según la cual todas las células reparadoras que participan en la regeneración de una herida o daño provienen del torrente sanguíneo y por lo tanto de la médula ósea (MO) ⁷. Quedó así perfectamente definida la función de las células derivadas de MO en la reparación de un daño.

Una vez establecida la idea de reparación de un daño producido en un tejido u órgano por medio de la administración de células, surgió el concepto moderno de “*Terapia Celular*”. Este término fue utilizado por primera vez por el Dr. Paul Niehans (1882-1971) quien, tras una experiencia realizada, comprobó que células de paratiroides de embrión de ternera habían sido capaces de reparar el daño producido accidentalmente en el paratiroides de un paciente a lo largo de una intervención quirúrgica de la glándula tiroidea ⁸.

A partir de este hallazgo la Terapia Celular quedó definitivamente incluida dentro de la Medicina Regenerativa y se definió como *“el proceso en el cual se introducen células en un paciente para tratar una determinada enfermedad”*.

La investigación y el desarrollo de la Terapia Celular continuaron a lo largo del S. XX destacando en este desarrollo los estudios realizados por el Dr. Edward Donnall Thomas (1920-2012), en el año 1965, relacionados con el trasplante de MO. El Dr. Thomas demostró que la inyección intravenosa (IV) de células derivadas de MO de individuos sanos en pacientes con insuficiencia medular severa e irradiados a una dosis letal, puede repoblar la MO dañada y regenerarla ⁹.

Este hallazgo fue reconocido con el Premio Nobel de Medicina en el año 1990 y el tratamiento fue considerado como “Terapia Celular” dentro de la Medicina.

En la investigación básica celular se produjeron también importantes hallazgos como el realizado por el Dr. Alexis Carrel (1873-1944), premio Nobel de Medicina en el año 1912 y pionero en el trasplante de órganos. El Dr. Carrel desarrolló un procedimiento según el cual los órganos amputados podían mantenerse en condiciones de viabilidad colocándolos en un caldo de cultivo provisto de todos los nutrientes indispensables para que las células de dicho tejido siguieran creciendo durante un largo periodo de tiempo. Este procedimiento surgió de una experiencia realizada con fibroblastos derivados de embriones de pollo los cuales fueron mantenidos en cultivo durante un periodo de tiempo de 34 semanas alimentados con suero y otros nutrientes. A partir de esta experiencia Carrel afirmó que las células animales explantadas poseían una capacidad ilimitada de división, siendo potencialmente inmortales ¹⁰.

En el año 1961 este concepto de *“inmortalidad celular”* fue descartado cuando Leonard Hayflick trató de reproducir los experimentos llevados a cabo por el Dr. Carrel en condiciones de cultivo más estrictas y descubrió que las células de embrión de pollo se dividían sólo 25 veces, tras las cuales entraban en senescencia replicativa y

se producía la muerte celular. Demostró con ello que el suero en el que Carrel había cultivado los fibroblastos de embrión de pollo no estaba bien filtrado y contenía nuevas células derivadas del embrión que rejuvenecían el cultivo celular.

Este experimento fue repetido con fibroblastos de embriones humanos y se observó que eran capaces de mantenerse en cultivo hasta un máximo de 50 divisiones tras las cuales se inducía la muerte celular.

De estos experimentos se pudo concluir que cada especie animal tiene un número máximo característico de divisiones celulares, denominado “Límite de Hayflick”, superado el cual las células se suicidan por activación de procesos apoptóticos.

Esta afirmación no era extrapolable a células cancerígenas en las cuales se había observado que no existe dicho “límite” pues poseen una capacidad de división ilimitada ¹¹.

En el año 1958, el biólogo Leroy Stevens (1920-2015), pionero en la investigación con células madre embrionarias, demostró que ciertas líneas de células tumorales poseían la capacidad de replicarse de forma indefinida en cultivo permaneciendo indiferenciadas con capacidad de auto-renovación y de diferenciación a un gran número de tejidos diferentes. Estas células fueron denominadas inicialmente “Células de Carcinoma Embrionario” (CE) y se identificaron fenotípicamente con marcadores de superficie comunes a células embrionarias y a células germinales.

A lo largo de la década de los años 80, se demostró que las CE eran células no malignas, presentaban un cariotipo normal y podían ser cultivadas generando una línea celular pluripotente con capacidad para diferenciarse a células de diversos, siendo renombradas como “*células madre embrionarias pluripotenciales*” (ESCs, *Embryonic Stem Cells*) ¹².

A partir de este importante hallazgo, se realizaron gran cantidad de estudios relacionados con las células germinales y embrionarias como el realizado por el

biólogo James A. Thomson en el año 1998. Thomson desarrolló la primera línea de células madre embrionarias a partir de la masa celular interna del embrión en estado de blastocisto ¹³ y demostró que estas células embrionarias, además de ser inmortales, ofrecían un gran potencial dentro de las Medicina Regenerativa.

A pesar de este gran hallazgo, el uso de blastocitos humanos, principalmente derivados principalmente de tratamientos de fertilización *in vitro*, ha generado controversia ética dentro del mundo científico. Además se ha demostrado que provocan rechazo inmunológico cuando son trasplantadas y tendencia a la formación de teratomas. Por ello, las ESCs son células difíciles de incorporar como Terapia Celular en la práctica clínica ¹⁴.

Para tratar de salvar esta barrera ética con las células embrionarias, en el año 2006 el equipo del Dr. Shinya Yamanaka descubrió el procedimiento para generar células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de fibroblasto de ratón adulto. En 2007, el grupo de investigación del Dr. Yamanaka y el del Dr. Thomson, de forma paralela, fueron capaces de producir por primera vez iPSCs procedentes de células adultas humanas. Este descubrimiento fue reconocido con el Premio Nobel de Medicina en el año 2012.

Las iPSCs poseen un grado de potencialidad equivalente a las células embrionarias pudiendo dar lugar a cualquier tipo celular y tejido humano, eliminando las barreras éticas con las que se habían encontrado los trabajos desarrollados con ESCs años atrás.

De forma paralela al desarrollo en el conocimiento de las ESCs y de las iPSCs, desde los años 50 se han realizado numerosos estudios para caracterizar las células troncales identificadas en el tejido del individuo adulto.

Entre estos estudios, destacamos los realizados por Jacobson ¹⁵ y Lorenz ¹⁶ quienes desarrollaron una nueva línea de investigación para determinar la Biología celular implicada en el tejido dañado por radiación ionizante en diversos modelos animales

con trasplante de células hematopoyéticas (HSCs) derivadas de MO. Los resultados obtenidos en estos trabajos fueron sorprendentes pues observaron que las HSCs poseían un gran potencial terapéutico en la reparación del tejido dañado no identificado hasta el momento.

A partir de estos resultados se iniciaron numerosos estudios para la caracterización fenotípica y funcional de las HSCs y fueron definidas como células derivadas del individuo adulto con gran capacidad de replicación, capaces de generar células hijas que mantienen con un elevado potencial de auto-renovación y de diferenciación a diversos tipos de células maduras para el desarrollo de funciones específicas del tejido en el cual se alojen ¹⁷.

En los años sucesivos se han producido importantes descubrimientos relacionados con células madre derivadas de individuo adulto procedentes de muy diversos tejidos como la MO y el tejido adiposo (TA) principalmente, el pulmón, el páncreas, el hígado, el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el tejido nervioso, la dermis, los folículos pilosos y el limbo corneal ¹⁸.

La identificación de células troncales en el individuo adulto ha favorecido el desarrollo de la investigación tanto básica como clínica en el campo de la Terapia Celular, área fundamental de la Medicina Regenerativa como disciplina emergente en Biomedicina.

1.2.-CÉLULAS TRONCALES

1.2.1.-Definición

Una célula troncal, o célula madre, es aquella capaz de dividirse indefinidamente, de diferenciarse morfológica y funcionalmente a distintos tipos celulares especializados como respuesta a determinados estímulos fisiológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y de permanecer asentada en el tejido en el que se aloja de forma persistente tanto en presencia como en ausencia de daño ^{19,20}.

1.2.2.-Clasificación

Las células troncales se clasifican según su potencial de diferenciación en totipotentes, pluripotentes y multipotentes ²⁰ (Fig. 1):

I.-Células totipotentes

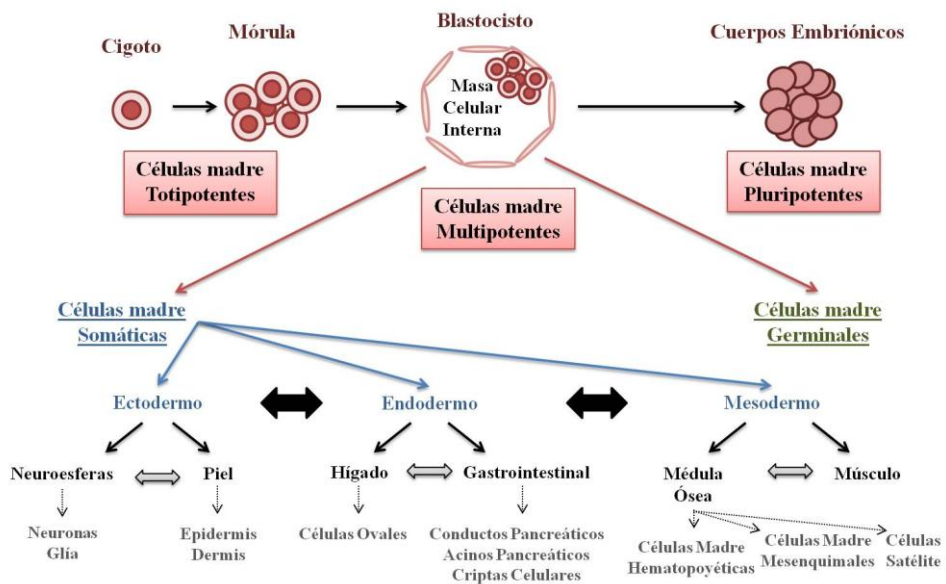
Son células que aparecen en las fases del desarrollo embrionario previas a la fase de blastocisto. Poseen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular derivado de una de las tres capas germinales del tejido embrionario (endodermo, mesodermo y ectodermo) y también a tipos celulares derivados del tejido extra-embrionario.

II.-Células pluripotentes

Son células que poseen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares derivados de cualquiera de las tres capas germinales.

III.-Células multipotentes

Este tipo celular posee la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares derivados de una única capa germinal.



Adaptación de An. Sist. Sanit. Navar. 2003, Vol.26, Nº3.

Figura 1.-Modelo jerárquico de las células madre según su potencial de diferenciación ²⁰.

Otra posible clasificación de las células troncales realizada en función del tejido de origen es:

I.-Células troncales embrionarias (ESCs, *embryonic stem cells*)

Son células totipotentes que derivan del embrión en la etapa previa al blastocisto.

II.-Células troncales adultas

Son células troncales pluripotentes derivadas del individuo adulto ¹⁸.

Los principales tipos son:

II.A.-Células mononucleadas derivadas de MO:

La población de células mononucleadas derivadas de MO (CMNs) está formada principalmente por tipos celulares de linaje hematopoyético como los progenitores hematopoyéticos, las células linfoides, monocitos y macrófagos ²¹, y por tipos celulares de estirpe no hematopoyética como la población celular identificada como “*side population*” (SPs) ^{22,23}, las células progenitoras multipotenciales adultas (*MAPCs, Multipotent Adult Progenitor Cells*) ^{20,24-26}, el hemangioblasto ^{27,28}, las células troncales embrionarias-like (*VSELs, Very Small Embryonic-like Stem Cells*) ^{25,29,30}, las células progenitoras endoteliales (EPCs) ^{31,32} o las células troncales comprometidas con el tejido (*TCSCs, Tissue-committed Stem Cells*) ^{29,33}.

II.B.-Células Mesenquimales derivadas del estroma:

Las células mesenquimales derivadas del estroma (MSCs, *Mesenchymal Stromal Cells*) son una población celular que ha sido identificada en multitud de tejidos como el cordón umbilical, la gelatina de Wharton de cordón umbilical ^{34,35}, el líquido amniótico, la pulpa dental, el periostio, el músculo esquelético, el páncreas, la placenta o el endometrio ^{36,37}, sin embargo las principales fuentes de MSCs son la MO y el TA.

En el año 1970, Friedenstein et al. ³⁸ aislaron por primera vez MSCs del estroma medular y en el año 2001, Zuk et al. ³⁹ las aislaron del estroma del tejido adiposo blanco.

Las MSCs derivadas de MO (MSCsMO) fueron inicialmente identificadas como una “rara” población celular (0,0001%-0,01%) fácil de aislar del resto de los

componentes celulares de la MO y de expandir *in vitro* debido a su gran capacidad de adherencia al plástico. Se ha demostrado que las MSCs son capaces de mantener su estado de pluripotencialidad a lo largo de unas 40 generaciones ³⁵.

Respecto a las MSCs derivadas de TA, denominadas por consenso internacional como “Células troncales ó mesenquimales derivadas de tejido adiposo” (ASCs: *Adipose stromal cells*), se demostró que presentaban las mismas características que la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society of Cell Therapy) había establecido como criterios fijos para las MSCsMO en el año 2006. Según dichos criterios las MSCs deben poseer gran capacidad de adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo, expresar en más del 95% de la población los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, no expresar los marcadores CD34, CD45, HLA-DR, CD14 o CD11b y CD79a o CD19 y presentar un alto potencial de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos ⁴⁰.

Debido a la abundancia de TA en el organismo, al reducido riesgo de mortalidad del donante durante el proceso de extracción y al alto contenido de MSCs en el tejido, las MSCsTA se han convertido en una alternativa a las MSCsMO en los estudios de Terapia Celular con fines terapéuticos ⁴¹.

En la literatura han sido descritas algunas diferencias entre las MSCsMO y las MSCsTA principalmente relacionadas con su potencial de diferenciación, su transcriptoma, su proteoma y su capacidad inmunomoduladora ³⁵. Sin embargo no se han publicado estudios en los cuales se hayan comparado las características *in vivo* e *in vitro* de ambas poblaciones celulares a lo largo de diferentes pases de cultivo.

A nivel funcional, independientemente de su origen, se ha observado que las MSCs participan en diversos procesos como la angiogénesis, la respuesta inflamatoria, quimiotaxis, inmunomodulación y regeneración.

Respecto a la angiogénesis, las MSCs participan secretando diversas señales y factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado del endotelio vascular

(VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) y el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α , *Hipoxia-inducible factor 1 α*)³⁴, interaccionando directamente con las células vecinas.

En el proceso inflamatorio, las MSCs atenúan la respuesta inflamatoria a través de la liberación de factores anti-inflamatorios como la Interleucina 4 (IL-4), la IL-10, el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β , *Transforming Growth Factor*) y el factor de necrosis tumoral inducible por la proteína 6 (TSG-6, *Tumor Necrosis Factor-stimulated gene 6 protein*)³⁵.

Respecto a su capacidad quimiotáctica, las MSCs son atraídas hasta el lugar del daño mediante los factores quimiotácticos liberados por las células dañadas que activan metaloproteinasas de la matriz induciendo la movilización de las MSCs³⁴.

La respuesta inmunomoduladora de las MSCs ha sido ampliamente descrita en la literatura^{19,35} según la cual las MSCs poseen una gran capacidad de inhibición de la proliferación y del reclutamiento de células T en la respuesta inmune a un daño³⁴ y de reducir la producción de citocinas pro-inflamatorias como el Interferón- γ , el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , *Tumor necrosis factor-alpha*) y la IL-2^{34,35}.

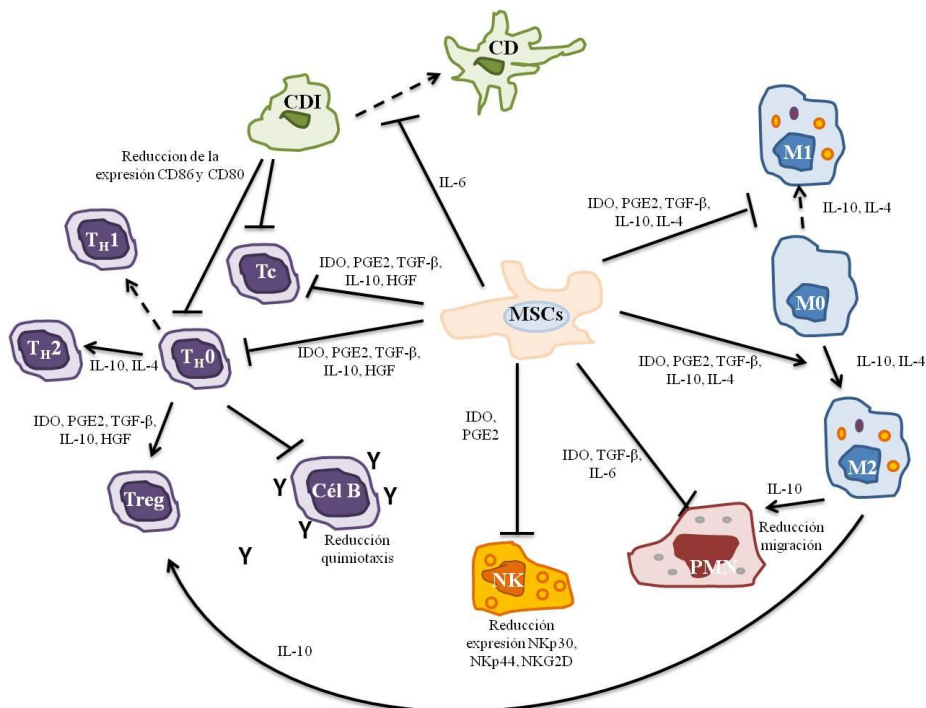
Esta inhibición de la proliferación de linfocitos T, analizada *in vitro*³⁵, se ha demostrado al observar que las MSCs reducen la activación de determinados receptores en las células citotóxicas o “*natural killer*” (NK) NKp30, NKp40 y NKG2D, y además bloquean el proceso madurativo de los linfocitos B en las fases G0/G1 de su ciclo celular y la maduración de las células dendríticas.

Esta combinación de procesos hace que la capacidad de expresión de antígenos y de moléculas co-estimuladoras necesarias para la activación de las células T quede reducida.

Además estudios recientes afirman que las MSCs, *in vivo*, podrían inducir la liberación de determinados factores inmunomoduladores por parte del tejido dañado en el cual son trasplantadas a través de mecanismos paracrinós, incrementando los

procesos de fagocitosis ³⁴ (Fig. 2). Sin embargo, respecto a esta teoría existen aún estudios con resultados contradictorios ^{42,43}, por lo que son necesarios futuros estudios.

Finalmente, respecto a la capacidad de regeneración de las MSCs, se ha observado que podría estar influenciada por el microambiente del tejido en el cual se alojan o son trasplantadas ³⁴.



*Adaptación revisión de Karantalis y cols. Circulation Research. 2015;116:1413-1430

Figura 2.-Capacidad inmunomoduladora de las MSCs. Esquema de la interacción entre las MSCs y el sistema inmune. **TH**: Células T Helper; **Tc**: células T citotóxicas; **Treg**: células T reguladoras; **CD**: células dendríticas; **M**: Monocito; **NK**: células Natural Killer, **Cél B**: células B; **HGF**: Factor de crecimiento de hepatocitos; **PGE2**: prostaglandina E2; **TGF-β**: factor de crecimiento transformante β; **IDO**: indoleamina-pirrol2-3-dioxigenasa (*imagen adaptada* ³⁴).

2.-TERAPIA CELULAR Y MIOCARDIOPATÍA DILATADA

2.1.-TERAPIA CELULAR EN CARDIOLOGÍA

Uno de los campos de Medicina Regenerativa que más expectativas ha creado dentro de la Terapia Celular ha sido su aplicación en Cardiología.

Según una teoría mantenida hasta finales del siglo XX, el corazón estaba constituido exclusivamente por células post-mitóticas sin capacidad de regeneración ni de reemplazo en caso de daño cardíaco.

En 1998 Anversa et al.⁴⁴ cuestionaron seriamente este concepto al evidenciar la capacidad de regeneración del miocardio post-infarto por sus propias células residentes, las cuales poseen una capacidad de auto-reparación limitada.

Estas células residentes, denominadas células troncales cardíacas residentes (CSCs, *Cardiac Stem Cells*), se demostró que poseían gran capacidad de regeneración del tejido cardíaco dañado y un potencial elevado de proliferación, por lo que se plantearon como posible alternativa al tratamiento convencional para la recuperación de daño cardíaco dentro de la Terapia Celular^{45,46}.

Sin embargo, más tarde fueron descartadas al ser descubierto que estas células eran incapaces de sobrevivir en un microambiente hipóxico, como el generado durante el proceso isquémico, en el que inducen apoptosis y muerte celular⁴⁷.

La población de EPCs, tanto derivada de MO como de sangre periférica (SP), ha sido ampliamente estudiada e incluida como tratamiento de Terapia Celular en Cardiología³².

Este tipo celular posee gran capacidad de movilización hasta el lugar del daño donde se diferencian a células endoteliales maduras y liberan proteínas citoprotectoras, citoquinas, factores de crecimiento y hormonas favoreciendo los procesos de migración y proliferación de las células endoteliales locales y los procesos neoangiogénicos autorregulados por las propias EPCs mediante la liberación de factores anti-angiogénicos que auto-regulan su propia función ^{48,49}.

La población de CMNs derivadas de MO también ha sido muy estudiada como tratamiento de Terapia Celular para la recuperación del daño cardíaco.

Estas células fueron administradas por primera vez en el año 2001 para la reparación del daño producido por infarto agudo de miocardio en un estudio realizado por el grupo de Strauer et al. ⁵⁰.

A partir de ese momento han sido numerosos los estudios realizados en los que esta población celular ha sido administrada como tratamiento para la mejoría de la función cardíaca obteniéndose resultados muy satisfactorios con una mejoría significativa de la funcionalidad del ventrículo izquierdo (VI) y un incremento en la perfusión del miocardio ⁵¹.

Respecto al uso de MSCs como tratamiento de Terapia Celular en el área de Cardiología, hasta la fecha se han desarrollado un gran número de estudios preclínicos a partir de los cuales se han podido identificar algunos de los mecanismos de acción de las células trasplantadas implicados en el proceso de recuperación del tejido dañado, los peligros potenciales de su administración y la reducida capacidad de retención y supervivencia de esta población celular dentro del tejido en el que son trasplantadas ³⁵.

Una alternativa a las limitaciones terapéuticas que presentan las MSCs, podría ser la combinación de la Terapia Celular con la Ingeniería Genética o el precondicionamiento celular ³⁵.

Otra población celular que ha sido estudiada como tratamiento de terapia celular en Cardiología son los mioblastos. Este tipo celular fue el primero en ser trasplantado para la regeneración cardíaca ⁵².

Los mioblastos son los precursores de las células musculares esqueléticas y poseen una capacidad limitada de diferenciación a tejido muscular lo que reduce el riesgo de formación de tumores en el tejido donde son trasplantadas. Sin embargo, en los estudios de terapia celular realizados con mioblastos se ha observado que una vez diferenciados a cardiomiocitos en el tejido cardíaco, no poseen la capacidad para acoplarse mecánicamente al resto de cardiomiocitos residentes supervivientes al daño, ni de establecer uniones densas, generando arritmias cardíacas en el individuo trasplantado ⁵³, por lo que han sido descartados como tratamiento de Terapia Celular para la recuperación del daño cardíaco.

Las ESCs, a pesar de haber sido demostrado, *in vitro*, su elevado potencial de diferenciación a cardiomiocitos funcionales, presentan limitaciones para su uso clínico en terapia celular debido a su elevada tendencia a la generación de teratomas, a su alto potencial de rechazo inmunológico y a importantes consideraciones éticas y morales debido a su origen embrionario humano ^{54,55}.

Estas limitaciones las descartan como posibles candidatas para su uso en ensayos clínicos de Cardiología en terapia celular.

Finalmente, las iPSCs son una población celular muy estudiada actualmente y candidata a ser utilizada como tratamiento para la reparación del tejido cardíaco dañado.

No se han observado hasta la fecha arritmias cardíacas ni teratomas en los estudios preclínicos realizados ^{56,57}, sin embargo para su aplicación en ensayos clínicos es necesario ampliar el conocimiento que existe hasta la fecha relacionado con el rechazo inmunológico que se genera tras su trasplante en el donante y con la formación de teratomas.

Debido a esta gran variedad de tipos celulares potencialmente utilizables en la regeneración cardíaca, actualmente la terapia celular trata de identificar cuál es la población celular que posee mayor capacidad regeneradora del tejido cardíaco dañado y cuáles son los mecanismos de actuación en dicha reparación, para trasladar este conocimiento desde la investigación básica a la práctica clínica.

2.2.-MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL DAÑO CARDIACO

Según la literatura publicada, los principales mecanismos identificados en la recuperación del daño cardiaco por parte de las células troncales adultas son los mecanismos paracrinos, de neovascularización y de remodelado cardiaco (Fig. 3).

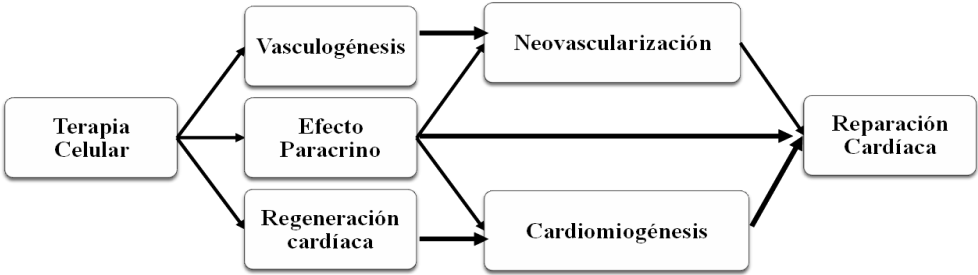


Figura 3.-Mecanismos de reparación del daño cardiaco por las células troncales adultas (según Gneccchi et al.⁵⁸).

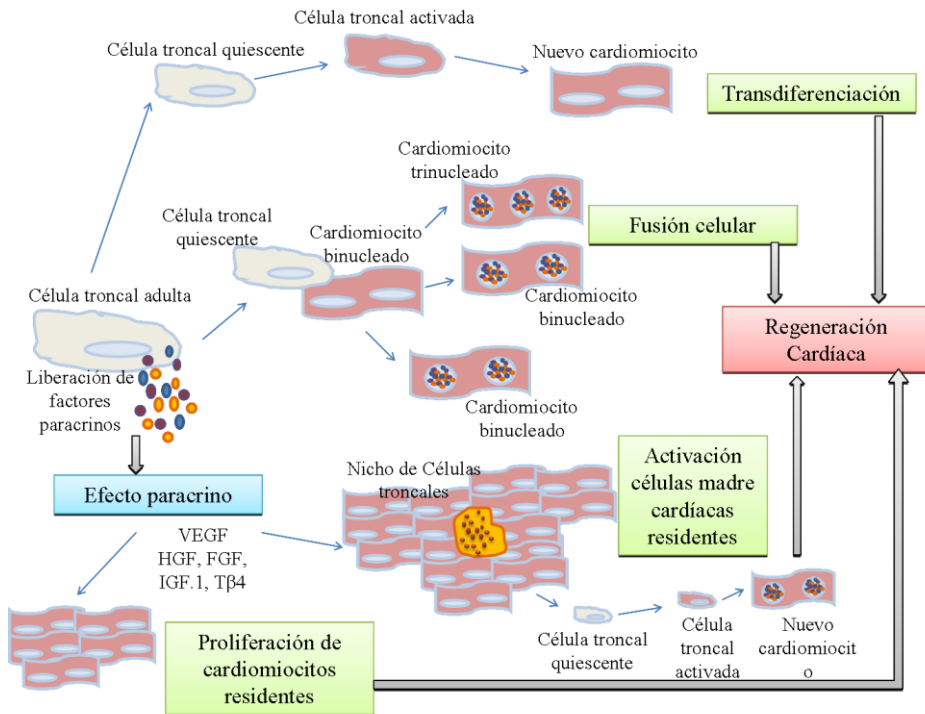
Recientemente ha sido planteada una nueva hipótesis respecto a la capacidad de regeneración del tejido cardiaco por parte de las células troncales trasplantadas, según la cual las células madre adultas trasplantadas en el corazón dañado pueden activar las células madre residentes, estimulando la replicación de los cardiomiocitos por medio de la acción paracrina, dando lugar a una regeneración cardiaca endógena⁵⁸.

Este podría ser considerado como un cuarto mecanismo de reparación del tejido cardiaco dañado por parte de las células troncales adultas trasplantadas, del cual existen muy pocos resultados publicados hasta la fecha.

El proceso de actuación de los distintos mecanismos de acción descritos en la literatura es:

I.-Mecanismos paracrinos

Los factores paracrinos liberados por las células troncales adultas trasplantadas participan activamente en el proceso de reparación del daño cardíaco movilizándolo células troncales del propio individuo hasta el lugar del daño o bien induciendo diferenciación de las propias células residentes del tejido dañado ⁵⁹ (Fig. 4).



*Adaptación revisión de Gnecci y cols. Circulation Research. 2008;103:1204-1219.

Figura 4.-Mecanismos implicados en la regeneración cardíaca por las células troncales adultas. 1^{er} Mecanismo: Transdiferenciación; 2^o Mecanismo: Fusión celular; 3^{er} Mecanismo: Liberación de Factores Paracrinos.

Los factores paracrinicos liberados por las células troncales trasplantadas pueden favorecer la activación de diversos mecanismos de reparación en las células residentes del tejido dañado como la neovascularización que comprometan la biología funcional de la célula troncal residente y modulen su respuesta al daño sufrido. Estos factores también pueden generar un efecto citoprotector sobre el miocardio incrementando la supervivencia de los cardiomiocitos residentes ⁵⁸.

II.-Procesos de neovascularización

Se ha demostrado que las células troncales adultas derivadas de MO expresan factores proangiogénicos como el VEGF y el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (*FGF_b*, *Fibroblast Growth Factor*) que favorecen el incremento de la densidad capilar y de los procesos de neovascularización en condiciones de daño isquémico ^{58,35}.

III.-Procesos de remodelado cardiaco

En diversos estudios preclínicos realizados para la reparación del daño cardiaco generado por miocardiopatía dilatada (MCD) se ha observado que el tratamiento con MSCs incrementa de un modo significativo la densidad capilar y reduce los depósitos de colágeno en el tejido dañado, disminuyendo la presión diastólica final del VI. Además se ha demostrado que las MSCs expresan metaloproteinasas implicadas en la biogénesis de la matriz extracelular del tejido lo que favorece el remodelado cardiaco a través de la reducción de la fibrosis, de la inhibición de los procesos apoptóticos de las células del tejido dañado y de la reducción en la dilatación del VI ⁵⁸.

2.3.-MIOCARDIOPATÍA DILATADA

La MCD es una enfermedad que afecta al músculo cardíaco, consiste en una dilatación e hipertrofia ventricular y en una disminución de la contractilidad con disfunción sistólica cuyo resultado final es la insuficiencia cardíaca ^{60,61}.

La incidencia de esta enfermedad en la población pediátrica es de 0,57 casos por cada 100000 niños y 10 veces superior en la población adulta, es decir, 0,57 casos por cada 10000 personas adultas. Esta aparente baja incidencia no resta valor a la enfermedad pues es la principal causa de insuficiencia cardíaca y trasplante cardíaco en el mundo.

Puesto que no se trata de una patología reversible, el tratamiento médico se limita a dar apoyo para mejorar la función cardíaca sin tratamientos realmente eficaces excepto el trasplante cardíaco el cual incrementa la supervivencia en niños en un 90% y en adultos en un 83%.

En la fisiopatología de la MCD, el corazón adquiere forma globular, las cavidades cardíacas se dilatan y se produce un engrosamiento del endocardio difuso con posible formación de trombos en su interior (Fig. 5).

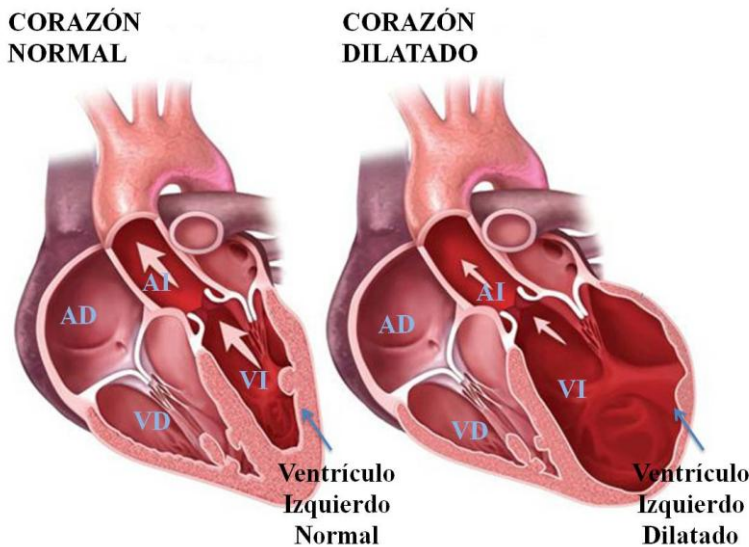


Figura 5.-Morfología de un corazón sano (izq.) y un corazón con MCD (der). AD: Aurícula Derecha, AI: Aurícula Izquierda, VD: Ventrículo Derecho, VI: Ventrículo Izquierdo.

No existe una lesión específica en la MCD, sino un remodelado ventricular general.

A nivel celular, se observan cardiomiocitos y células contráctiles en muerte celular inducida por procesos apoptóticos, en necrosis o hipertrofia compensadora, sin pérdida de la capacidad proliferativa del resto de las células miocárdicas.

A nivel histológico, se observa una alteración en la configuración de las fibras de colágeno de la matriz extracelular, responsable tanto de la arquitectura cardíaca como del alineamiento de los miocitos, generando una fibrosis intersticial.

A nivel ultra-estructural se observa hipertrofia miofibrilar, fibrosis intersticial y perivascular, y alteraciones degenerativas como edema celular, gránulos de lipofucsina y mitocondrias pequeñas.

A nivel serológico se detectan inmunoglobulinas ligadas al miocardio y anticuerpos anti-cardiacos como la IgG y C3.

A nivel morfológico y funcional, el corazón presenta un espesor parietal ligeramente disminuido con escasa diferencia entre la fase diastólica y sistólica del VI, dilatación auricular izquierda por insuficiencia mitral, VI con aspecto esférico, aumento del diámetro del eje corto, contraste espontáneo del VI y distintos grados de derrame pericárdico.

Finalmente, a nivel neuroendocrino, en los pacientes con MCD se detectan niveles alterados de noradrenalina, renina, angiotensina II y aldosterona que se relacionan directamente con la severidad de la cardiopatía y el pronóstico de la enfermedad. El factor natriurético auricular se eleva precozmente en la insuficiencia cardíaca (IC) antes incluso de la presencia de síntomas ⁶¹.

Todas estas alteraciones provocan un remodelado patológico del corazón caracterizado principalmente por el aumento de la masa miocárdica, dilatación ventricular cuyas paredes mantienen un grosor normal o reducido ⁶⁰.

La MCD puede generarse a partir de un proceso inflamatorio o a partir de otra patología.

En el caso de la MCD inflamatoria, puede desarrollarse como consecuencia de una respuesta autoinmune del individuo, por un proceso infeccioso o puede tener un origen idiopático. La activación del sistema inmunitario del propio individuo provoca el daño en el tejido miocárdico debido al proceso inflamatorio desencadenado en el que se pueden identificar anticuerpos circulantes, también denominados auto-anticuerpos, dirigidos contra un amplio espectro de proteínas cardíacas o auto-antígenos e infiltrados linfocitarios ⁶⁰.

En el caso de que el origen de la MCD sea una patología previa, ésta puede ser de origen neuromuscular, de origen metabólico o isquémico, entre otras causas.

Debido a diversidad etiológica de la MCD no es posible establecer un único tratamiento. Actualmente la opción terapéutica más eficaz a largo plazo es el trasplante cardiaco puesto que el tratamiento convencional sólo mejora la función cardiaca muy a corto plazo.

La terapia basada en la administración de células madre se ha convertido en una importante alternativa terapéutica para la MCD.

2.4.-DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA EN TERAPIA CELULAR APLICADA LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

En los años 90 se realizaron los primeros trasplantes de células en pacientes que habían sufrido infarto agudo de miocardio como terapia alternativa para la recuperación de la función cardíaca.

Estos primeros tratamientos tenían como objetivo principal la restauración de la función sistólica y diastólica del corazón infartado.

Los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios ⁶²⁻⁶⁶ y se comenzaron a aplicar en otras patologías cardíacas como la MCD.

Los primeros estudios preclínicos en MCD fueron los desarrollados por el grupo de Scorsin et al. ⁶⁷, en el año 1998, y por el grupo de Yoo et al. ⁶⁸, en el año 2000. Ambos grupos desarrollaron un modelo animal de MCD inducida por mecanismos diferentes (doxorubicina y ciclosporina A, respectivamente), administraron cardiomiocitos como tratamiento de la MCD y en sus resultados observaron que a nivel histológico en el tejido cardíaco se localizaban zonas que presentaban una reorganización de las fibras cardíacas y a nivel funcional una mejoría significativa de la función contráctil.

Estos primeros resultados impulsaron la investigación preclínica en Terapia Celular aplicada a la MCD.

En el año 2001 Pouly et al. ⁶⁹ diseñaron un estudio basado en un modelo genético de MCD en hámster en el cual modificaron tanto la forma de administración del tratamiento, mediante múltiples inyecciones intramiocárdicas (IM), como el tipo celular utilizado, mioblastos esqueléticos autólogos, y observaron una mejoría final de

la función sistólica del VI significativa respecto al grupo control, a pesar de haber desarrollado a nivel histológico un significativo empeoramiento de la fibrosis en la zona de inyección del tratamiento celular en el miocardio. Este empeoramiento fue justificado por la posible reacción inflamatoria que las múltiples punciones realizadas para la administración del tratamiento celular podían haber producido.

En el mismo año, el grupo de Suzuki et al.⁷⁰ realizaron un estudio basado en un modelo murino de MCD inducida por doxorrubicina en el cual plantearon como objetivo principal obtener una mayor diseminación de las células trasplantadas por todo el tejido cardiaco afectado por la MCD, inyectando un millón de mioblastos esqueléticos singénicos por vía coronaria. Los resultados funcionales de este estudio mostraron un 17% de ganancia en la función tanto sistólica como diastólica del VI en el grupo de animales con MCD que habían sido tratados con mioblastos respecto al grupo control. Del análisis inmunohistoquímicos observaron injertos generalizados de mioblastos diferenciados en el tejido cardiaco en el cual habían sido trasplantados, alineados axialmente con las fibras cardiacas del huésped.

En 2005, Werner et al.⁷¹ realizaron un estudio *in vitro* cuyo objetivo principal fue determinar el grado de afectación a nivel funcional de la MCD sobre determinados tipos celulares comparando la funcionalidad de células extraídas de ratas sanas respecto a células derivadas de ratas con MCD inducida por un proceso autoinmune. Los tipos celulares que se compararon fueron EPCs derivadas de la MO y EPCs derivadas de bazo y observaron que las EPCs derivadas de ratas con MCD, independiente de su origen, presentaban una funcionalidad reducida en comparación con las derivadas de ratas sanas. De este trabajo se pudo concluir que el daño cardiaco provocado por la MCD afecta a la funcionalidad de las células progenitoras del individuo.

En el año 2006, el grupo de Hata et al.⁷², para superar los problemas relacionados con las altas tasas de mortalidad derivados de los estudios preclínicos en los cuales el tratamiento celular había sido administrado por vía IM, desarrollaron un sistema de administración de un tratamiento combinado de células e ingeniería tisular, y evaluaron su viabilidad y eficacia en un modelo canino de MCD inducida mecánicamente. El tratamiento consistió en la colocación de injertos de mioblastos crecidos sobre una lámina a una concentración de 1,5-2,5 millones de mioblastos/lámina y observaron que los animales trasplantados con células mostraban una mejoría significativa en algunos de los parámetros cardíacos funcionales analizados como la fracción de eyección (FE), la fracción de acortamiento (FA) y el volumen final diastólico (VFD) además de un incremento en el grosor de la pared del VI.

Otro estudio que introduce modificaciones en la vía de administración, en la dosis y en el tipo celular administrado ha sido el publicado por Nagaya et al.⁷³ en el año 2005. Este grupo, basándose en un modelo murino de MCD autoinmune inducida con miosina de origen porcino, administraron una dosis de cinco millones de MSCsMO por vía IM en diez puntos distintos del miocardio. Al finalizar el estudio, cuatro semanas tras la administración del tratamiento celular, observaron un descenso en la presión final del VI en diástole y una mejoría muy significativa de la capacidad contráctil del corazón con lo que demostraron que las MSCsMO trasplantadas poseían capacidad de regeneración del tejido cardíaco dañado a nivel funcional.

En el año 2007 se diseñó el primer estudio con células modificadas genéticamente. Este estudio fue desarrollado por Kondoh et al.⁷⁴, quienes administraron 20 millones mioblastos modificados genéticamente para potenciar la expresión del factor de crecimiento hepático (HGF) en un modelo en hámster de MCD y observaron una recuperación de la función sistólica en el grupo tratado con

mioblastos modificados mayor a la observada en el grupo tratado con los no modificados.

En ese mismo año, Baba et al.⁷⁵ volvieron a introducir una nueva variante en su estudio. En este caso la MCD fue inducida con doxorubicina en un modelo murino y la variante fue el tipo celular administrado como tratamiento que consistió en ESCs derivadas de ratón seleccionadas genéticamente para la expresión elevada del factor Flk-1 (marcador de células indiferenciadas del mesodermo con capacidad de diferenciación a cardiomiocitos). Como resultado del estudio observaron que estas células poseían la capacidad de inclusión en el tejido cardíaco del VI junto a los cardiomiocitos residentes y de acople al ritmo contráctil. Sin embargo, un inconveniente importante en la utilización de estas células fue la aparición de tumores en el lugar donde fueron trasplantadas.

En el año 2008 fueron realizados gran cantidad de estudios preclínicos entre los que destaca el desarrollado por Tezuka et al.⁷⁶ quienes a partir de un modelo murino en hámster deficientes de la proteína δ -sarcoglicano, administraron mioblastos esqueléticos por vía IM directa. También cabe destacar el trabajo de Yamada et al.⁷⁷ quienes desarrollaron un modelo murino de MCD inducida con doxorubicina y como tratamiento administraron ESCs genéticamente modificadas por vía IM o el trabajo realizado por Nakajima et al.⁷⁸ en el cual desarrollaron un modelo murino de MCD inducida con doxorubicina y administraron CMNs como tratamiento por vía IM y por vía IV.

En todos estos estudios se observó una mejoría en los parámetros hemodinámicos, funcionales e histológicos analizados manteniendo la teoría de que Terapia Celular podía ser beneficiosa para la recuperación del daño cardíaco causado por la MCD.

La investigación preclínica continuó a lo largo de los años sucesivos pero no se establecieron criterios comunes respecto al diseño de los distintos estudios desarrollados por lo que resulta muy complicado obtener una conclusión sólida del beneficio aportado por los distintos tratamientos celulares administrados en la recuperación del daño cardíaco provocado por la MCD.

Sí se puede afirmar de forma generalizada que tras la administración de los distintos tratamientos celulares se observa una mejoría significativa de los distintos parámetros cardíacos analizados.

Esta falta de criterios comunes es evidente al comparar estudios como el realizado por Sun et al.⁷⁹, desarrollado en un modelo murino de MCD inducida con miosina de origen porcino cuyo tratamiento son CMNs, o el estudio publicado por Shabbir et al.⁸⁰ basado en un modelo de MCD en hámster genéticamente modificados en el que son administradas MSCsMO directamente en el músculo esquelético, o el trabajo de Garbage et al.⁸¹ quienes a partir de un modelo de MCD inducida con doxorubicina en conejos, administran CMNs como tratamiento directamente en el VI, o realizado por Jin et al.⁸² que desarrollan un modelo en conejos de MCD inducida con adriamicina.

Respecto al tipo celular, según la bibliografía publicada hasta la fecha, las MSCs son la población celular más utilizada como tratamiento en los distintos estudios preclínicos realizados, sin embargo, la dosis de MSCs administradas, la vía de administración y el modelo animal seleccionado varía entre los distintos estudios.

La primera administración de MSCs derivadas de MO inyectadas para el tratamiento de la MCD autoinmune inducida en un modelo murino fue realizada por el grupo de Shabbir et al.⁸⁰ en el año 2009, quienes inyectaron a través de la pared anterior del VI una dosis de 1,2 millones de MSCs y observaron una mejoría tanto a nivel funcional como histológico de casi todos los parámetros analizados.

Tras ser publicados estos resultados prometedores del tratamiento de la MCD con MSCsMO, fueron diseñados numerosos estudios preclínicos en los cuales el modelo animal seleccionado (conejo ⁸³, oveja ⁸⁴ o rata ⁸⁵), la dosis celular administrada (entre 1 millón de MSCs ⁸³ y 5,5 millones ⁸⁴) y la vía de administración del tratamiento (pared anterior del VI ⁸³, transendocárdica ⁸⁴ o IV ⁸⁵) mantienen la variabilidad respecto a los criterios seleccionados entre los distintos estudios.

Debido a esta variabilidad, resulta complicado comparar los resultados derivados de todos ellos para obtener una conclusión sólida respecto al beneficio de la administración de MSCsMO como tratamiento de la MCD en la recuperación del daño cardíaco provocado.

Otro tipo celular de gran importancia utilizado en estudios preclínicos como tratamiento de la MCD inducida son las MSCs derivadas de TA. El primer estudio fue realizado en el año 2010 ⁸⁶. Sin embargo, al igual que sucedió con los estudios preclínicos anteriormente desarrollados con MSCsMO, el diseño de éste y siguientes ensayos no mantuvieron criterios comunes respecto a la selección del modelo animal (rata ^{86,87} o conejo ⁸¹), el método de inducción de la MCD (doxorubicina ^{81,87} o miosina de origen porcino ⁸⁶) o el número de células administrado (entre un millón ⁸¹ y dos millones ^{86,87}).

Debido a esta gran variabilidad no es posible obtener una conclusión firme respecto a la eficacia de las MSCs derivadas de TA en el tratamiento de la MCD ni de comparar dicha eficacia con la de las MSCsMO.

En los últimos años, la Terapia Génica y la Ingeniería de Tejidos han sido también desarrolladas en estudios preclínicos como posibles alternativas a los tratamientos convencionales para la MCD como el desarrollado en el año 2015 por Yu et al. ⁸⁸. En este estudio, a partir de un modelo murino de MCD inducida con furazolidona, se administraron como tratamiento MSCsMO genéticamente modificadas con el plásmido humano recombinante VEGF165. Los resultados

mostraron una mejoría significativa de la función cardíaca en el grupo de animales tratado con células respecto al resto de grupos.

En el año 2016 se realizó otro estudio preclínico de ingeniería tisular basado en un modelo canino de MCD en el cual fueron implantaron en el tejido miocárdico mioblastos esqueléticos adheridos a una lámina⁸⁹ para el tratamiento de la MCD, en el que se observó una moderada recuperación de la función sistólica y diastólica del VI en los animales tratados con mioblastos.

A pesar de la gran cantidad de estudios preclínicos que se han realizado hasta la fecha, y que se continúan realizando en la actualidad, la amplia variedad de modelos animales de MCD desarrollados, de tipos celulares y dosis administradas, de vías de administración utilizadas, de tiempos de evaluación considerados y de parámetros seleccionados para la evaluación del grado de recuperación de la MCD, resulta necesario el diseño de estudios que mantengan criterios comunes y permitan realizar análisis comparativos respecto a la eficacia de los distintos tratamientos celulares administrados en la recuperación del daño causado por la MCD para así poder trasladar dicho conocimiento de la investigación preclínica a la práctica clínica, objetivo principal de la Investigación Biomédica Traslacional.

Justificación

JUSTIFICACIÓN

La MCD es una enfermedad primaria del miocardio caracterizada por la pérdida de cardiomiocitos y por el incremento de fibroblastos en el tejido cardiaco lo que constituye una causa importante de insuficiencia cardiaca.

Debido a la diversidad etiológica de la enfermedad, no ha sido posible establecer un único tratamiento dentro de la práctica clínica siendo actualmente el trasplante cardiaco la opción terapéutica más eficaz para los pacientes con MCD avanzada.

En los últimos años se ha producido un gran desarrollo en la investigación aplicada al tratamiento de la MCD en el área de la terapia celular tanto en ensayos clínicos como a nivel preclínico.

Son numerosos los estudios preclínicos diseñados para determinar el grado de eficacia y seguridad de las células administradas pero se trata de estudios muy heterogéneos en puntos tan críticos como el protocolo de inducción de la MCD, el tipo celular seleccionado para el tratamiento, la vía de administración, los tiempos de evaluación del seguimiento o las variables de evaluación del grado de recuperación del miocardio. Estas diferencias hacen que los resultados no puedan ser comparables por lo que resulta complicado obtener conclusiones robustas.

En la literatura revisada no se ha encontrado publicado ningún estudio preclínico en el que se comparen entre sí los tipos celulares más habitualmente investigados en un único modelo animal y con un único diseño experimental.

El presente trabajo se justifica en base a la necesidad de disponer de un estudio preclínico único en el que se comparen los tres tipos celulares (CMNs, MSCsTA y MSCsMO) considerados como principales candidatos al uso en clínica para el tratamiento de la Miocardiopatía Dilatada humana.

Para ello han sido definidos los parámetros considerados críticos para la evaluación de la eficacia de los tres tipos celulares en la reparación del daño miocárdico causado por MCD: el modelo animal de inducción de la MCD, la dosis y la vía de administración de las células, el día de infusión celular, el tiempo de seguimiento de la MCD post- tratamiento y los parámetros de análisis que deben ser evaluados en el punto final del estudio para determinar el grado de eficacia del tratamiento:

1. Modelo animal seleccionado

Para la selección del modelo animal se realizó una amplia revisión bibliográfica y se observó que el modelo murino de MCD inducido por la administración de miosina de origen porcino era uno de los modelos mejor validados por la literatura y presentaba un tiempo de inducción y un tiempo de reversión bien definidos.

2. Dosis y vía de administración seleccionada

La dosis celular administrada de 5 millones de células por inyección, fue seleccionada como punto intermedio entre las dosis administradas en los distintos estudios publicados y la vía de administración intramiocárdica fue la más utilizada en la literatura.

3. Selección del tiempo de infusión celular y seguimiento, y parámetros evaluados

El día seleccionado para la infusión celular y el tiempo de seguimiento post-tratamiento se han establecido en función de los criterios descritos en el modelo animal seleccionado, validados por la literatura.

La selección de parámetros para evaluar de la recuperación cardiaca se ha realizado a partir de los más utilizados en la bibliografía publicada.

Hipótesis

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis a partir de la cual se desarrolla este trabajo de tesis es que las células mononucleadas derivadas de médula ósea, las células mesenquimales derivadas de médula ósea y las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo no poseen la misma capacidad de recuperación funcional del daño cardíaco producido por la MCD.

Objetivos

OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo principal del presente estudio consiste en comparar *in vitro* y en un modelo animal los tres tipos celulares (CMNs, MSCsMO y MSCsTA) principales candidatos al uso clínico en terapia celular de la MCD humana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1^{er} Objetivo específico

Caracterización “*in vitro*” de cada uno de los tipos celulares que serán administrados como tratamiento de la MCD inducida en el modelo murino a desarrollar.

- 1.1.-**Caracterizar fenotípica, morfológica y funcionalmente los distintos tipos celulares.
- 1.2.-**Comparar la capacidad de secreción de factores paracrinicos de los distintos tipos celulares.
- 1.3.-**Seleccionar en base a sus características, la población celular que será administrada a los animales en el objetivo específico 2.

2º Objetivo específico:

Comparar “*in vivo*” los efectos de la inyección intramio cárdica de CMNs, MSCsMO y MSCsTA sobre la recuperación funcional y morfoestructural del tejido cardíaco dañado por la MCD inducida en un modelo murino autólogo.

2.1.-Comparar la capacidad de recuperación funcional del ventrículo izquierdo del corazón de rata con MCD inducida tras la administración de los distintos tipos celulares.

2.2.-Comparar la capacidad de regeneración de las fibras cardíacas dañadas por la MCD inducida tras la administración de distintos tratamientos celulares.

2.3.-Comparar la capacidad neoangiogénica y vasculogénica de los distintos tipos celulares administrados como tratamiento de la MCD inducida.

2.4.-Comparar la capacidad de inhibición del proceso fibrótico y de reducción del tejido cicatricial de cada uno de los tipos celulares administrados.

2.5.-Comparar la secreción de factores paracrinos que favorezcan el proceso regenerativo de cada uno de los tipos celulares administrado en el tejido cardíaco dañado.

Material y Métodos

1.-DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente estudio se ha realizado en dos fases. En una primera fase, *in vitro*, se ha desarrollado una extensa caracterización morfológica, fenotípica y funcional de los tres tipos celulares en estudio para elegir, en el caso de las MSCs, el pase de cultivo más favorable para el desarrollo de la fase 2, correspondiente al modelo animal (Fig. 6).

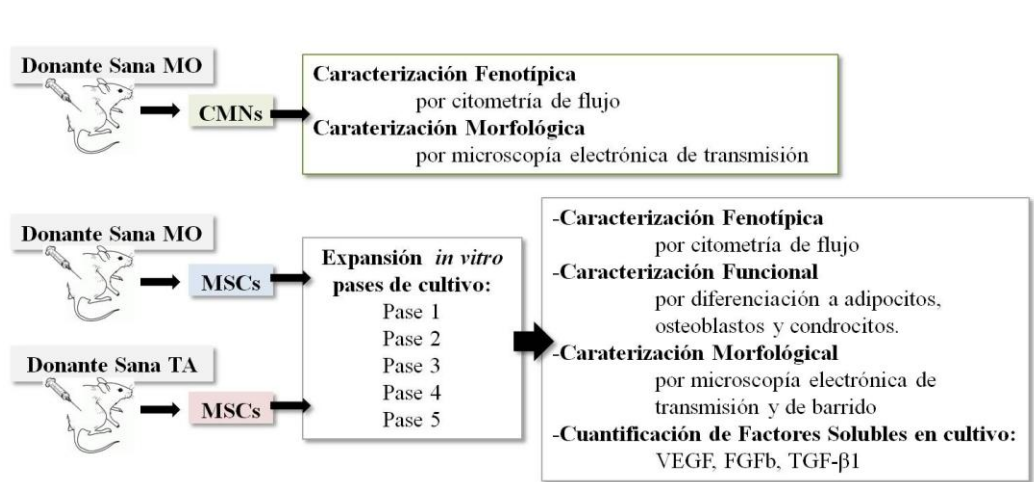


Figura 6.-Diseño experimental del estudio *in vitro*.

En la segunda fase, *in vivo*, se ha desarrollado un modelo animal en ratas Wistar en las que se ha inducido MCD a través de una miocarditis autoinmune⁹⁰, y se han infundido por vía IM los tres tipos celulares seleccionados, derivados de ratas donantes isogénicas para la simulación de un modelo de trasplante autólogo.

En este estudio se ha comparado la capacidad de recuperación de la función cardíaca y de reorganización de las fibras musculares del tejido cardíaco dañado de cada uno de los tipos celulares administrados como tratamiento de la MCD inducida, introduciendo como referencia o grupo control el tratamiento con placebo (Fig. 7).

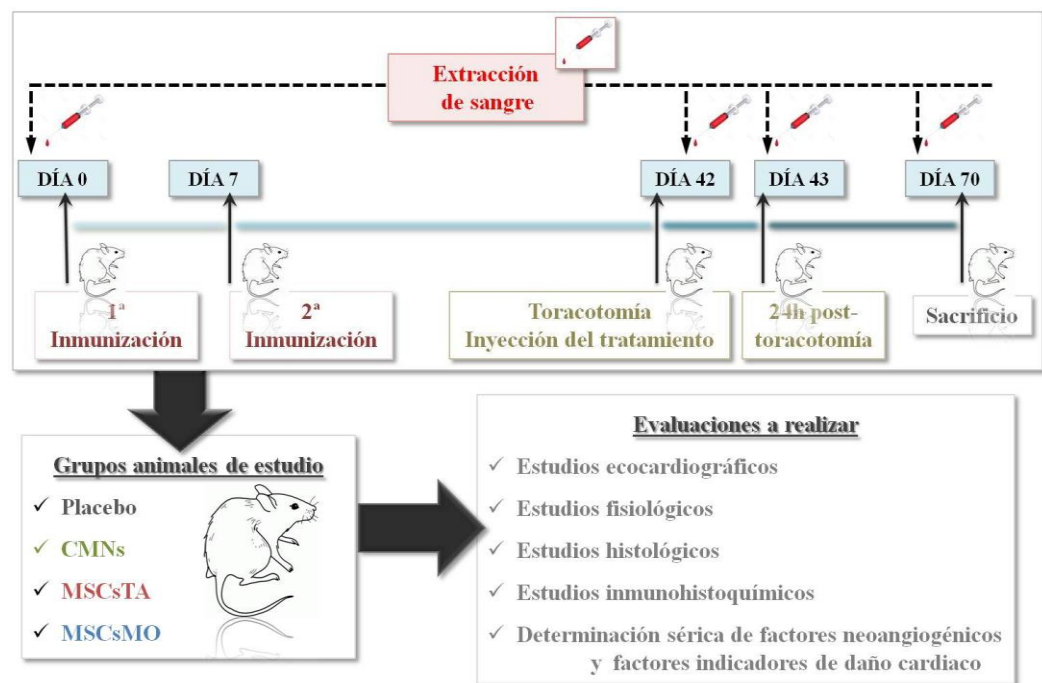


Figura 7.-Diseño experimental del estudio *in vivo*.

Los procedimientos experimentales llevados a cabo fueron previamente aprobados por el Comité Andaluz de Experimentación Animal bajo la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, según lo dispuesto en la normativa legal vigente, RD 223/1988 sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Esta aprobación fue posteriormente revisada, según el RD 53/2013, por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba como órgano habilitado por la Dirección General de Producción Agrícola y Ganadera de la Junta de Andalucía para la evaluación de proyectos de experimentación animal.

Durante el desarrollo del estudio, los animales permanecieron alojados con suministro de agua y comida *ad libitum*, en el bioterio de la Unidad Experimental del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC) de Córdoba.

2.-CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO CELULAR

2.1.-AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS PROCEDENTES DE RATAS WISTAR SANAS DONANTES

Las CMNs fueron aisladas de la MO contenida en la epífisis del fémur y tibia de ratas Wistar macho donantes sanas de 9 ± 2 semanas de edad y 200 ± 20 g de peso.

El procedimiento se inició con el sacrificio de los animales por sedación con tiopental sódico (125mg/Kg), administrado por vía intraperitoneal (IP), y por exanguinación por punción de la aorta abdominal.

Una vez extraídos el fémur y la tibia, se realizaron varios lavados de la cavidad ósea interior con suero salino heparinizado y mezcla de antibióticos (0.1mg/mL estreptomicina y 100UI/mL penicilina) para obtener la MO. Para eliminar los restos de tejido óseo y muscular, la suspensión celular obtenida fue lavada por centrifugación, filtrada en membranas de filtración de tamaño de poro $70\mu\text{m}$ y $40\mu\text{m}$ (BD Biosciences) y fraccionada por centrifugación en gradiente de densidad con ficoll-hypaque (Lymphoprep™, Oslo, Norway) para separar la fracción de CMNs del resto de componentes celulares de la MO.

Se determinó la viabilidad celular con azul tripán (Lonza, Verviers, Belgium) y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer.

Finalmente, las CMNs fueron resuspendidas en solución de dimetil-sulfóxido (Sigma-Aldrich) (DMSO) diluido al 10% en suero fetal bovino (FBS) y alicuotadas a una concentración final de 5×10^6 células por mL para la congelación del producto

celular final, en un equipo CRYOMED (Mod.8027, Forma Scientific), criopreservándolas a -196°C de temperatura en nitrógeno líquido hasta la realización de los estudios posteriores. Las muestras congeladas quedaron registradas en una citoteca.

2.2.-AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE MSCsTA DE RATAS WISTAR SANAS DONANTES

Las MSCs fueron aisladas a partir de TA subcutáneo localizado en la zona inguinal y peritoneal de ratas Wistar macho donantes sanas de 9 ± 2 semanas de edad y $200\pm 20\text{g}$ de peso.

El procedimiento se inició con el sacrificio de los animales por sedación con tiopental sódico (125mg/Kg), administrado por vía IP, y por exanguinación por punción de la aorta abdominal.

El TA se extirpó según procedimiento validado por la literatura ⁹¹, se troceó en pequeñas porciones y se centrifugó para separar la fracción estromal del resto de células adipocíticas maduras. La fracción del estroma adiposo resultante se incubó en solución de Colagenasa tipo I (Sigma Aldrich) para su completa disgregación, se lavó por centrifugación y se resuspendió en solución salina heparinizada con estreptomicina (0.1mg/mL) y penicilina (100UI/mL).

La suspensión celular final obtenida se filtró en membranas de filtración de tamaño de poro $100\mu\text{m}$ y $40\mu\text{m}$ (BD Biosciences) y se resuspendió en 1mL de medio de cultivo $\alpha\text{-MEM}$ (Alpha-Minimun Essentials Medium, Lonza) enriquecido con FBS (15%), ultra-glutamina (2mM), estreptomicina (0.1mg/mL), penicilina (100UI/mL) y factor de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGF-2, Sigma Aldrich) (1ng/mL) para

determinar su viabilidad con azul tripán (Lonza, Verviers, Belgium) y realizar el recuento celular en cámara de Neubauer.

La suspensión celular final se sembró en frascos de cultivo Nunc de 75 cm² (Nunc EasYFlask, Thermo Scientific) a una densidad de $5,3 \times 10^4$ células/cm² en 15mL medio α -MEM completo y se incubó a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 24h. Finalizada dicha incubación, se refrescó el medio de cultivo, se incubó de nuevo, renovándolo cada 72h hasta obtener una confluencia celular en cultivo del 80% aproximadamente.

En este punto las células fueron tripsinizadas con solución tripsina/EDTA (ReagentPack™ Subculture Reagents, Lonza) neutralizando la acción de la enzima con solución neutralizante (TNS) (ReagentPack™ Subculture Reagents, Lonza) y lavando con tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) por centrifugación. El pellet resultante se resuspendió en 1mL de medio de cultivo α -MEM completo, se determinó la viabilidad de la suspensión celular resultante con azul tripán y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer, sembrando de nuevo en frascos de cultivo de 75cm² a una densidad de $6,7 \times 10^3$ células/cm².

Tras este primer subcultivo realizado, las MSCsTA expandidas se consideraron en su pase 0 de cultivo, repitiendo todo el proceso hasta obtener MSCsTA en los pases 1, 2, 3, 4 y 5.

Las células sobrantes de cada uno de los subcultivos realizados se resuspendieron en solución de DMSO al 10% en FBS para su congelación en un equipo CRYOMED y se criopreservaron a -196°C de temperatura en nitrógeno líquido hasta la realización de los estudios posteriores. Las MSCsTA congeladas quedaron registradas en una citoteca.

2.3.-AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA DE RATAS WISTAR SANAS DONANTES

Las MSCs fueron aisladas de la MO contenida en la epífisis del fémur y tibia de ratas Wistar macho donantes sanas de 9 ± 2 semanas de edad y 200 ± 20 g de peso siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito para la obtención de MO (pto. 2.1).

Una vez obtenida y filtrada la suspensión celular, se resuspendió en 1mL de medio de cultivo α -MEM completo^{92,93} se determinó la viabilidad celular con azul tripán y se realizó el recuento en cámara de Neubauer.

La suspensión celular obtenida se sembró en frascos de cultivo Nunc de 25 cm² (Nunc EasYFlask, Thermo Scientific) a una densidad de $5,3\times 10^4$ células/cm² en 5mL de medio α -MEM completo y se incubó a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 48h. Finalizada la incubación, se renovó el medio de cultivo, se incubó de nuevo, se renovó el medio cada 72h, manteniéndolo hasta obtener una confluencia celular en cultivo del 80% aproximadamente.

Las células en cultivo confluyente se tripsinizaron y lavaron siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (pto. 2.2), y finalmente fueron sembradas en frascos de cultivo NUNC de 75cm² a una densidad de $6,7\times 10^3$ células/cm².

Tras este pase 0 de cultivo, se repitió el procedimiento hasta obtener MSCsMO en los pases 1, 2, 3, 4 y 5.

Las células sobrantes de cada uno de los pases fueron criopreservadas siguiendo el procedimiento anteriormente descrito (pto. 2.2), permaneciendo congeladas hasta la realización de los estudios posteriores y registradas en una citoteca.

2.4.-CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE CÉLULAS MONONUCELADAS Y CÉLULAS MESENQUIMALES

La caracterización y determinación de la homogeneidad de las poblaciones de CMNs y MSCs se realizó mediante identificación y cuantificación de los distintos marcadores de membrana específicos de cada población celular. Para este propósito se utilizaron anticuerpos mono y/o policlonales conjugados con distintos fluorocromos como el isocianato de fluoresceína (FITC), la ficoeritrina (PE) y la aloficocianina, (APC).

Para la caracterización fenotípica de las CMNs se cuantificaron los marcadores CD34, CD45, CD117 y CD133, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados derivados de ratón anti-rata CD34-FITC (Santa Cruz, Biotechnology) y CD45-FITC (BD Pharmigen™) y anticuerpos policlonales conjugados derivados de conejo anti-rata CD117 (c-Kit)-FITC (LifeSpan Biosciences) y CD133-PE (Novus Biologicals) ⁹⁴.

Para la caracterización fenotípica de las MSCs se cuantificaron los marcadores CD34, CD45, CD90 y CD29 utilizando los anticuerpos monoclonales conjugados derivados de ratón anti-rata CD34-FITC (Santa Cruz, Biotechnology), CD45-FITC y CD90-APC (BD Pharmigen™) y el anticuerpo monoclonal conjugado derivado de hámster anti-rata CD29-FITC (BD Pharmigen™) ^{95,96}, aplicando los mismos criterios establecidos para las MSCs humanas por la ISCT ⁴⁰.

El análisis de la complejidad granular citoplasmática (SSC, Side Scatter) y del tamaño de cada población celular (FSC, Forward Scatter) se realizó cuantificando la dispersión frontal y lateral, respectivamente, del haz de luz incidente sobre las células al ser adquiridas en el citómetro de flujo.

Las células muertas o no viables fueron marcadas con yoduro de propidio (IP) (Miltenyi) para poder ser descartadas del recuento total de la población analizada. Las células viables fueron identificadas como IP negativas.

El protocolo de caracterización fenotípica para las CMNs y las MSCs fue idéntico. Las distintas suspensiones celulares fueron alicuotadas en tubos de citometría (BD Falcon™) a una concentración de 5×10^5 células por tubo en un volumen de PBS de 500 μ L. En cada tubo se añadieron 5 μ L de cada uno de los anticuerpos conjugados a cuantificar y se incubaron durante 15 minutos a 4°C en oscuridad, eliminando los restos de anticuerpo no unidos a su receptor por centrifugación una vez finalizada la incubación. Las células no viables fueron marcadas con IP y seguidamente se realizó la adquisición de las distintas suspensiones celulares en el citómetro de flujo MACSQUANT (Miltenyi, Bergisch Gladbach, UK).

Se adquirieron 1×10^5 eventos de cada muestra y el resultado de dicha adquisición se analizó con el software MACSQuantify™ Versión 2.5.

2.5.-CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS MESENQUIMALES

La caracterización funcional de las MSCs se realizó mediante el análisis de su potencial de diferenciación adipogénico, osteogénico y condrogénico.

El protocolo de caracterización se llevó a cabo en los cinco pases de cultivo de las MSCs, tanto derivadas de MO como derivadas de TA, y fue idéntico para todas las poblaciones.

En primer lugar las muestras celulares criopreservadas fueron descongeladas en un baño a 37°C, lavadas por centrifugación para eliminar los restos de crioprotector y resuspendidas en 1mL de PBS para determinar su viabilidad y recuento celular. Finalmente cada suspensión celular fue resuspendida en medio de cultivo específico suplementado con factores inductores correspondientes a cada proceso de diferenciación.

2.5.1.-Diferenciación adipogénica

Este estudio fue realizado en placas de cultivo de 6 pocillos de BD Falcon™. En cada pocillo se sembraron $2,9 \times 10^5$ MSCs en 2mL de medio de cultivo α -MEM completo.

Los cultivos fueron incubados a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 48h. Finalizada dicha incubación, se refrescó el medio y se volvió a incubar bajo las mismas condiciones realizando renovaciones de medio fresco cada 72h hasta obtener una confluencia celular en cultivo del 90%.

En este momento, el medio α -MEM fue reemplazo por medio de cultivo específico suplementado con factores inductores de la adipogénesis (Adipogenic Induction Medium SingleQuots®, Lonza), manteniendo el cultivo durante 8 o 10 días más hasta observar en las células vacuolas de grasa intracitoplasmáticas. Las células fueron cultivadas durante 3 días más en medio específico para el mantenimiento de los adipositos diferenciados (Adipogenic Maintenance Medium SingleQuots®, Lonza).

Finalizado el proceso de diferenciación, las vacuolas de grasa intracitoplasmáticas de las MSCs diferenciadas se tiñeron con colorante Oil Red (Sigma Aldrich) y los núcleos con hematoxilina para realizar el análisis observacional de la capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCs por microscopía óptica. Para ello, las células teñidas fueron observadas a través del microscopio Nikon Eclipse TE2000-S con objetivo 10x y las imágenes adquiridas con cámara fotográfica Nikon DS-U2 acoplada al microscopio y procesadas con el software de análisis NIS-Element AR 3.2.

Para la determinación del potencial de diferenciación adipogénico de las MSCs se analizaron un total de 20 imágenes por muestra.

2.5.2.-Diferenciación Osteogénica

Este estudio fue realizado en placas de cultivo de 6 pocillos de BD Falcon™. En cada pocillo se sembraron $1,9 \times 10^5$ MSCs en 2mL de medio de cultivo α -MEM completo.

Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada y 5% de CO₂ durante 24h. Finalizada dicha incubación, el medio α -MEM fue reemplazo por medio de cultivo específico suplementado con factores inductores de la osteogénesis (Osteogenic-Differentiation Basal Medium SingleQuots®, Lonza), manteniendo el cultivo durante 21 días más hasta observar depósitos de Ca⁺² liberados al espacio extracelular y una red celular formada por osteoblastos diferenciados.

Los depósitos de Ca⁺² fueron teñidos con el colorante Alizarín Red para determinar la capacidad de diferenciación osteogénica de las MSCs por microscopía óptica. Para ello, las muestras teñidas se observaron a través de un microscopio Nikon

Eclipse TE2000-S con objetivo 10x y las imágenes adquiridas con cámara fotográfica Nikon DS-U2 acoplada al microscopio y procesadas con el software de análisis NIS-Element AR 3.2.

Un total de 20 imágenes por muestra fueron analizadas para determinar el potencial de diferenciación osteogénico de las MSCs.

2.5.3.-Diferenciación Condrogénica

El potencial de diferenciación condrogénico de las MSCs se determinó a partir de cultivos realizados en tubos de fondo cónico de 15ml de capacidad (BD Falcon™).

En cada tubo se sembraron $2,5 \times 10^5$ MSCs en un volumen de 500μL de medio de diferenciación condrogénico (Completed StemXVivo Rat Chondrogenic Differentiation Media, R&D System). Durante 21 días las células se incubaron a 37° en atmósfera humidificada y 5% de CO₂, renovando el medio cada 72 horas.

Tras dicho periodo de tiempo, la micromasa diferenciada fue procesada para su análisis y caracterizada por microscopía electrónica de transmisión, método seleccionado por su elevada sensibilidad en la identificación y localización de las distintas estructuras morfológicas y componentes celulares de la micromasa condrocítica diferenciada⁹⁷.

El procesamiento de las micromasas se realizó mediante su fijación en glutaraldehído al 2,5% y tetróxido de osmio al 1% y su posterior inclusión en resina epoxi polimerizada para la formación de un bloque compacto. Se realizaron cortes ultrafinos de 0,1μm de grosor, se colocaron sobre rejillas de cobre y níquel y se contrastaron con uranil saturado y citrato de plomo para ser observadas a través del

microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem 1400 (Jeol, Japón) de alta resolución ubicado en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) del campus universitario de Rabanales en Córdoba.

El análisis morfológico y ultraestructural de cada una de las secciones se realizó a través de las imágenes adquiridas en modo *.tiff* con el software de microanálisis Inca energy 200 tem y Aztec de adquisición de imágenes acoplado al propio equipo. Por cada muestra fueron adquiridas y analizadas 10 imágenes.

2.6.-CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS MONONUCELADAS Y CÉLULAS MESENQUIMALES

La caracterización morfológica de las CMNs se realizó por microscopía electrónica de transmisión.

La caracterización morfológica de las MSCs fue realizada por microscopía electrónica de barrido y por microscopía electrónica de transmisión sólo en aquellas poblaciones de MSCs que tras el análisis fenotípico y morfológico presentaron características homogéneas entre ellas y fueron seleccionadas como tratamiento a administrar en el estudio *in vivo* posteriormente desarrollado.

Las poblaciones celulares analizadas morfológicamente fueron las MSCsMO en pase 2 de cultivo (MSCsMOp2) y las MSCsTA en pase 5 (MSCsTAp5).

Previo al procesamiento de las muestras, las suspensiones celulares fueron descongeladas siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (pto 2.5) y resuspendidas en PBS. De cada una de las muestras se realizó un frotis para evaluar la integridad celular tras el proceso de descongelación. Para ello se colocó una gota de la

suspensión celular sobre el porta, se extendió en forma de fina capa, se dejó secar a temperatura ambiente, se añadió unas gotas de metanol frío para fijar las células y éstas fueron teñidas con Giemsa. Las preparaciones celulares teñidas se observaron en un microscopio Nikon Eclipse TE2000-S ubicado en la Unidad de Terapia Celular del HURS, con objetivo de 40×.

2.6.1.-Caracterización por microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis de las distintas muestras por microscopía electrónica de transmisión, las suspensiones celulares (CMNs, MSCsMOp2 y MSCsTAp5) se resuspendieron en glutaraldehído al 2,5% y tetróxido de osmio al 1% como fijadores, se deshidrataron con distintas soluciones de etanol en concentraciones crecientes y se incluyeron en resina epoxi para la formación de un bloque compacto. En los distintos bloques se realizaron cortes ultrafinos de 0,1µm de grosor con un ultramicrotomo LKB III. Estos cortes se colocaron sobre rejillas de cobre y níquel y se contrastaron con uranilo saturado y citrato de plomo.

La caracterización morfológica de las distintas muestras procesadas se realizó a través del microscopio electrónico Jeol Jem 1400 (Jeol, Japón) de alta resolución ubicado en el SCAI del campus universitario de Rabanales en Córdoba, mediante el análisis detallado de las imágenes adquiridas en modo *.tiff* a través del software de adquisición de imágenes para su microanálisis Inca energy 200 tem y Aztec, acoplado al propio equipo. Un total de 20 imágenes fueron adquiridas por cada muestra procesada.

2.6.2.-Caracterización por microscopía electrónica de barrido

Para la caracterización morfológica de las MSCs por microscopía electrónica de barrido las células fueron sembradas en cultivo en placas de 6 pocillos (BD Falcon™).

En cada uno de los pocillos de las placas, previo a la siembra de las MSCs, se colocó un cubre estéril de plástico Thermanox de 22mm de diámetro (Thermo Scientific, Nunc, USA). Un total de $6,4 \times 10^4$ de MSCs fueron sembradas por pocillo en 2mL de medio α -MEM completo e incubadas a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ hasta alcanzar el cultivo una confluencia celular del 90-95%, renovando el medio cada 72 horas.

Finalizado el cultivo, del fondo de cada pocillo se retiró el cubre de plástico con las MSCs adheridas.

Estas células adheridas al cubre fueron fijadas con solución de glutaraldehído al 2,5%, deshidratadas en distintas soluciones de acetona en concentraciones crecientes y recubiertas con oro coloidal en un sombreador BAL-TEC SCD005 ubicado en el SCAI del campus universitario de Rabanales en Córdoba.

La caracterización morfológica de las distintas muestras procesadas se realizó a través del microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6300 de alta resolución, ubicado en el SCAI del campus universitario de Rabanales en Córdoba, mediante el análisis detallado de las imágenes adquiridas.

La adquisición de imágenes se realizó a través del software de microanálisis X-act 80 acoplado al propio equipo. Un total de 20 imágenes fueron adquiridas en los tres aumentos disponibles del microscopio: 270x, 330x y 600x.

2.7.-CUANTIFICACIÓN DE FACTORES SOLUBLES SECRETADOS POR LAS CÉLULAS MESENQUIMALES EN CULTIVO

La cuantificación de factores secretados por las MSCs en cultivo fue realizada en los días +4 y +7 de cultivo en todos los pases.

El estudio fue realizado en placas de cultivo de 6 pocillos de BD Falcon™. Una vez descongeladas las distintas alícuotas celulares, en cada pocillo se sembraron $6,4 \times 10^4$ MSCs en 2mL de medio α -MEM completo. Todos los pocillos se sembraron por triplicado (Fig. 8).

Para la cuantificación del día +4 de cultivo, las MSCs se incubaron durante 72 horas (día +3) a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada y 5% de CO₂, se renovó el medio y se continuó la incubación durante veinticuatro horas más hasta la recogida del sobrenadante de cada pocillo.

Para la cuantificación del día +7 de cultivo, las MSCs se incubaron durante 72 horas (día +3), se renovó el medio y se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 72 horas más (día +6), se volvió a renovar el medio incubando durante veinticuatro horas más hasta la recogida del sobrenadante de cada pocillo.

El cambio de medio realizado veinticuatro horas antes de la recogida de los sobrenadantes permitió expresar el resultado de la cuantificación de cada factor en pg/mL de medio por cada 10.000 MSCs cultivadas durante 24 horas.

Una vez recolectados todos los sobrenadantes, se centrifugaron para eliminar cualquier partícula contaminante que interfiera en la cuantificación final, y se

realizaron alícuotas de 300µL en tubos eppendorf, criopreservándolas a -80°C de temperatura hasta la realización de los distintos experimentos.

En cada uno de los sobrenadantes fue cuantificado el factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A (VEGF-A), el factor de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGF-2) y del factor de crecimiento transformante-β1 (TGF-β1) mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Las MSCs adheridas al fondo de cada uno de los pocillos en los que fue recolectado el sobrenadante se tripsinizaron y lavaron en PBS para determinar su viabilidad celular y el recuento en cada pocillo de la placa de cultivo.

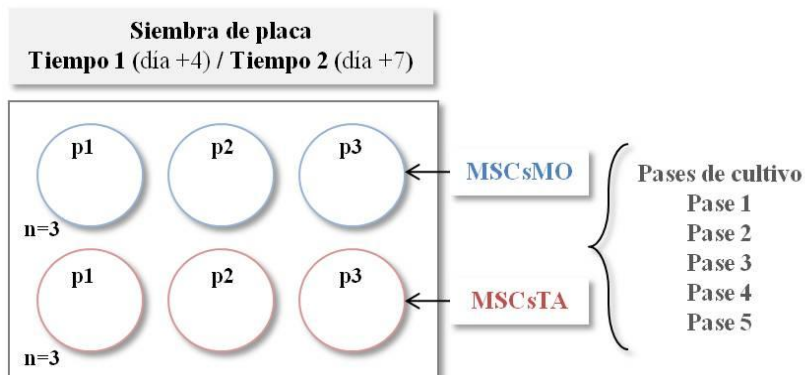


Figura 8.-Diseño del experimento de cuantificación de factores secretados por MSCs en cultivo el día +4 (tiempo 1) y el día +7 (tiempo 2).

p1: pocillo 1, p2: pocillo 2 y p3: pocillo 3 = mismo experimento por triplicado.

2.7.1.-Factor derivado del endotelio vascular tipo A

La cuantificación de la concentración de VEGF-A en el sobrenadante del cultivo de las MSCs se realizó con el kit de ELISA comercial de RayBio® “Rat VEGF ELISA, RayBiotech” en una placa de 96 pocillos.

Se prepararon diluciones seriadas de VEGF-A_{rat} estándar conocidas, siendo la máxima concentración 200pg/mL y la mínima 0,82pg/mL. Con estas diluciones conocidas se elaboró la curva estándar final con la que fueron cuantificadas las distintas concentraciones de VEGF presentes en las muestras analizadas. Como blanco o muestra sin VEGF-A se utilizó el propio diluyente de las muestras.

Todos los pocillos de la placa de ELISA fueron por duplicado.

A cada pocillo se añadieron 100µL de las diluciones realizadas con el VEGF-A_{rat} estándar o 100 µL de las distintas muestras a cuantificar, según el caso.

Se incubó en agitación suave para inmovilizar el VEGF-A contenido en cada una de las muestras y se retiró el exceso una vez finalizada la incubación.

Seguidamente se añadió a cada pocillo 100µL de anticuerpo secundario anti-VEGF-A_{rat} marcado con biotina, incluido en el kit, incubándolo para su fijación al VEGF-A inmovilizado al fondo de la placa.

Finalizada la incubación se retiró el exceso de anticuerpo secundario, se añadió a cada pocillo 100µL de enzima peroxidasa HRP (HorseRadish Peroxidase) conjugada con estreptavidina y se incubó para permitir la fijación al anticuerpo biotinilado ya adherido al fondo de la placa.

A continuación, y tras eliminar el exceso de enzima, se añadieron 100µL de solución de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno como sustrato produciéndose una reacción enzimática cuyos productos resultantes presentaron un color azul que viró

al amarillo tras añadir 50 μ L de solución 0,2M de ácido sulfúrico a cada pocillo como solución stop de la reacción enzimática.

La intensidad del color obtenida fue directamente proporcional a la cantidad de VEGF-A y fue cuantificada como absorbancia a una longitud de onda de 450nm (λ_{450nm}) en un lector de placas Optic IVYMEN® System (Mod. 2100C).

A partir de las absorbancias obtenidas se calculó la concentración final de VEGF en cada uno de los pocillos aplicando la fórmula derivada de la recta patrón resultante en la representación gráfica de las concentraciones estándares del VEGF-A_{rat} (eje abscisa) y sus correspondientes absorbancias (eje ordenadas).

La concentración mínima de VEGF-A detectable por el ensayo fue de 2pg/mL.

2.7.2.-Factor de crecimiento transformante tipo β 1

La cuantificación de la concentración de TGF- β 1 en el sobrenadante de las MSCs cultivadas se realizó con el kit de ELISA comercial de Invitrogen™ “ELISA Kit *Multispecies* TGF- β 1” en una placa de 96 pocillos.

Se prepararon diluciones conocidas de TGF- β 1 estándar proporcionado por el kit desde una concentración máxima 2000 pg/mL hasta una concentración mínima de 31,2 pg/mL. Como blanco o muestra control sin TGF- β 1 se utilizó el propio diluyente incluido en el kit.

200 μ L de cada una de las diluciones del TGF- β 1 estándar y de las muestras a cuantificar, y 50 μ L de anticuerpo secundario anti-TGF- β 1 marcado con biotina fueron añadidos a cada pocillo, por duplicado, excepto en los pocillos considerados como “cero estándar”.

Esta mezcla se incubó para permitir la fijación del TGF- β 1 de las distintas muestras al anticuerpo específico y al biotilizado.

Finalizada la incubación, el exceso de anticuerpo se retiró y se añadieron 100 μ L de enzima peroxidasa HRP conjugada con estreptavidina a cada pocillo, excepto en los pocillos “cero estándar”, para su fijación al anticuerpo.

Se retiró el exceso de enzima y 100 μ L de solución de tetrametilbencidina (TMB) se añadieron a cada pocillo desencadenando una reacción enzimática cuyos productos resultantes mostraron un color azul que viró al amarillo tras añadir a cada pocillo 50 μ L de ácido sulfúrico 0,2M como solución stop a dicha reacción.

La intensidad del color resultó directamente proporcional a la cantidad de TGF- β 1 contenido en cada pocillo. Dicha intensidad de luz fue cuantificada como absorbancia ($\lambda_{450\text{nm}}$) en un lector de placas Optic IVYMEN® System (Mod. 2100C).

La concentración final de TGF- β 1 en cada uno de los pocillos se calculó a partir de la fórmula de la recta patrón resultante en la representación gráfica de las distintas concentraciones conocidas del TGF- β 1 estándar (eje de abscisa) frente a sus absorbancias (eje de ordenadas).

La concentración mínima detectable de TGF- β 1 por el ensayo fue de 15,6pg/mL.

2.7.3.-Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2

La cuantificación de la concentración de FGF-2 en el sobrenadante de las MSCs cultivadas se realizó con el kit de ELISA comercial de R&D System “Quantikine®ELISA Mouse/Rat FGF basic” en una placa de 96 pocillos.

Se prepararon diluciones conocidas del FGF-2 estándar proporcionado por el kit desde una concentración máxima 100pg/mL hasta una concentración mínima de 15,6pg/mL. Como blanco o muestra control sin FGF-2 se utilizó el propio diluyente incluido en el kit.

En cada pocillo de la placa de ELISA, y por duplicado, se añadieron 100μL de cada una de las diluciones del FGF-2 conocidas o 100 μL de las distintas muestras a cuantificar.

Se incubó en agitación suave para inmovilizar el FGF-2 de cada una de las muestras al fondo del pocillo, retirando el exceso una vez finalizada la incubación.

Seguidamente, se añadieron 100μL de anticuerpo secundario específico FGF-2 de ratón/rata conjugado con la enzima HRD peroxidada y tras incubarlo y lavar los pocillos, se volvió a incubar con 100μL de solución de TMB añadidos a cada pocillo. Durante la incubación se produjo la reacción enzimática cuyos productos resultaron de color azul el cual viró al amarillo tras añadir a cada pocillo 50μL de ácido sulfúrico 0,2M como solución stop a dicha reacción.

La intensidad del color resultó directamente proporcional a la cantidad de FGF-2 fijado inicialmente en el fondo de la placa. Esta intensidad de luz fue cuantificada como absorbancia ($\lambda_{450\text{nm}}$) en un lector de placas Optic IVYMEN® System (Mod. 2100C).

La concentración final de FGF-2 en cada uno de los pocillos se calculó a partir de la fórmula de la recta patrón resultante de la representación gráfica de las concentraciones de FGF-2 estándares (eje abscisa) frente a sus valores de absorbancia obtenidos (eje de ordenadas).

La concentración mínima de FGF-2 detectable por el ensayo fue de 1,42pg/mL.

2.8.-DETERMINACIÓN DE LA TASA DE DUPLICACIÓN DE CADA POBLACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES

La tasa de duplicación de la población celular a lo largo del tiempo de cultivo (PD, *Population Doubling*) fue calculada para ambas poblaciones de MSCs en todos los pases de cultivo mediante la fórmula:

$$\begin{aligned} & \textit{Tasa de duplicación de la población celular} = \\ & = (\text{Log } N^{\circ} \textit{ final de MSCs}) - (\text{Log } N^{\circ} \textit{ inicial de MSCs}) / (\text{Log } 2) \end{aligned}$$

El número inicial de MSCs sembradas en todos los cultivos fue de $6,4 \times 10^4$ de MSCs por pocillo.

Para conocer el número final de células en cada pocillo, una vez retirados los sobrenadantes, las MSCs, tal como se ha explicado anteriormente (pto. 2.7), fueron tripsinizadas y lavadas con PBS por centrifugación.

El pellet resultante se resuspendió en 1mL de PBS y se determinó la viabilidad de la suspensión celular con azul tripán y el recuento en cámara de Neubauer.

3.-DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL MODELO MURINO DE MIOCARDIOPATÍA DILATADA

3.1.-INDUCCIÓN DE LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA

Para el modelo animal se utilizaron de 66 ratas Wistar macho sanas de 8 semanas de edad con un peso medio de 200 ± 50 . Todos los animales fueron randomizados inicialmente en cuatro grupos: grupo control o placebo (n=16), grupo CMNs (n=16), grupo MSCsTA (n=17) y grupo MSCsMO (n=17).

Previo al inicio del estudio, las ratas permanecieron en cuarentena bajo la supervisión del personal técnico del bioterio de la Unidad Experimental durante 7 días, sin ser sometidas a ninguna manipulación para determinar su estado de salud.

La fase experimental se inició con la inducción de la MCD en todas las ratas incluidas en los cuatro grupos de estudio mediante la generación de una miocarditis autoinmune tras la administración de dos dosis de miosina derivada de corazón porcino separadas por un intervalo de tiempo de 7 días (día +1 y día +7).

La miosina actuó como antígeno desencadenando una reacción inmunitaria en el 100% de las ratas tratadas.

Ambos procedimientos de administración del antígeno se iniciaron con la sedación del animal por vía inhalatoria (INH) en una caja de inducción del equipo de anestesia con suministro de gas sevoflurano a una concentración del 6% (Fig. 9A) mantenido hasta la pérdida completa de estación del animal.

En este punto, la sedación fue mantenida reduciendo la concentración de sevoflurano al 3,5%, trasladando el animal a la mesa de trabajo (Fig. 9B).

Se realizaron varias punciones en diversos puntos de las almohadillas de las patas traseras hasta inyectar 0,2mL de la solución antigénica compuesta por miosina derivada de corazón porcino y adyuvante completo de Freund. Las punciones fueron realizadas con jeringa de 1mL de volumen y aguja de 0,5mm×16mm (Fig. 9C y 9D).

La mezcla antigénica inyectada se preparó a partir de 0,1mL de miosina de origen porcino disuelta en Cloruro potásico (KCl) y PBS a una concentración de 10,0mg/mL, (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y de 0,1mL de adyuvante completo de Freund, preparado a partir de 10mg de *Mycobacterium tuberculosis H37 RA* (Difco laboratories, Detroit, EEUU) disuelto en 1mL de adyuvante incompleto de Freund (Difco laboratories, Detroit, EEUU).

Finalizada la administración de la mezcla antigénica, se interrumpió el suministro de gas anestésico manteniendo la observación del animal hasta su completa recuperación, tanto del ritmo cardiorrespiratorio como de la movilidad.

Según el procedimiento descrito para la inducción de la MCD por miocarditis autoinmune, ampliamente validado por la literatura ^{73,90,98}, y en base a las pruebas funcionales realizadas, posteriormente descritas (pto. 4.1), 5 semanas después de la administración de la segunda dosis del antígeno las ratas desarrollaron una disfunción cardíaca similar a la observada en la miocardiopatía dilatada de humanos.

Este fue considerado como el punto de máximo daño del estudio correspondiéndose con el día +42, cinco semanas tras la segunda inmunización con miosina.

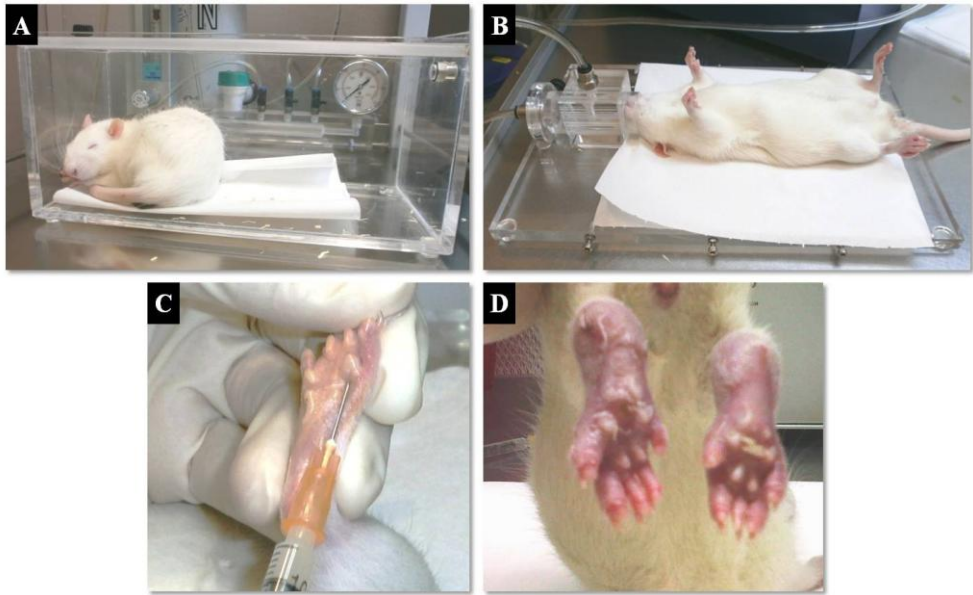


Figura 9.-Procedimiento de inducción de la miocardiopatía dilatada en ratas Wistar. A, Sedación del animal en caja de inducción. **B,** Mantenimiento de la sedación en mesa de trabajo. **C,** Inyección de 0,2mL de solución antigénica en almohadilla de pata trasera. **D,** Inflamación crónica de los miembros inferiores tras la administración de la solución antigénica.

3.2.-ADMINISTRACIÓN DE LA TERAPIA CELULAR

El día +42 se llevó a cabo el procedimiento de administración IM de los productos celulares o placebo en todos los animales.

El protocolo por el cual se procesaron los distintos tipos celulares para ser administrados como tratamiento fue idéntico.

Dicho procesamiento se inició con la descongelación de las suspensiones celulares criopreservadas siguiendo el protocolo anteriormente descrito (pto. 2.5), resuspendiéndolas finalmente en 1mL de suero fisiológico (SF) para determinar la

viabilidad celular por el método de tinción con azul tripán y el recuento en cámara de Neubauer.

5 millones de células de cada tipo celular fueron alicuotadas en eppendorf en un volumen de 100µL de SF. Para el grupo de ratas receptoras de CMNs se descongelaron 14 muestras (n=14) y para los grupos de ratas receptoras de MSCsTA y de MSCsMO se descongelaron 16 muestras de cada tipo celular (n MSCsTA = 16; n MSCsMO =16).

A cada rata receptora se le administraron células procedentes de una única rata donante.

Para la administración del placebo en el grupo control, se prepararon 14 alícuotas de 100µL de SF (n=14).

Los productos celulares o placebo se administraron por vía IM ^{73,96,99} mediante toracotomía lateral izquierda a nivel del quinto espacio intercostal.

Para este procedimiento quirúrgico, las ratas fueron anestesiadas por vía INH con sevoflurano al 6% y mezcla de oxígeno (Fig. 10A), con un seguimiento continuo de la frecuencia cardiorrespiratoria del animal.

Las ratas sedadas fueron colocadas en posición decúbito supino sobre la mesa de trabajo y entubadas por vía endotraqueal permaneciendo conectadas a un respirador automático Harvard de pequeños animales (Harvard Apparatus, EEUU) cuya frecuencia respiratoria se mantuvo entre 105-110 respiraciones/minuto, administrando un volumen de mezcla de gases de 2,5L/respiración al 3% de sevoflurano (Fig. 10B)

Entubado el animal, se colocó en posición decúbito lateral derecho, rasurando y aseptizando el área del costado izquierdo a intervenir. Se realizó una primera incisión en la línea media anterior del tórax de unos 2,5cm de longitud (Fig. 10C), disecando la piel y separando los músculos pectorales, y una segunda incisión sobre la línea medio clavicular del espacio intercostal entre la 4ª y la 5ª hasta penetrar en la cavidad

torácica. Con la ayuda de un retractor Weitlaner (FST, Heidelberg, Alemania) se separaron las costillas, muy cuidadosamente, quedando el corazón expuesto a la altura del VI y del ápex (Fig. 10D) procediendo a la inyección del tratamiento en dos puntos de la zona media y en dos de la zona apical del miocardio ventricular izquierdo del corazón con una jeringa y aguja Hamilton® (Hamilton® Company, USA) de 26G (Fig. 10E).

Al inicio de este procedimiento se administró fentanilo citrato a una dosis de 0,02 mg/Kg de peso del animal por vía IP como analgésico.

Los productos celulares administrados según los grupos de estudio fueron los siguientes:

- 100µL de SF: grupo control (n=14)
- 5×10^6 CMNs en 100µL de SF en el grupo CMNs (n=14)
- 5×10^6 MSCsTA en 100µL de SF: grupo MSCsTA (n=16)
- 5×10^6 MSCsMO en 100µL de SF: grupo MSCsMO (n=16)

Finalizada la administración del tratamiento, se retiró el retractor, se cerró la cavidad torácica con sutura reabsorbible monofilamento 3-0, se unieron los músculos intercostales y pectorales con sutura sintética absorbible multifilamento trenzada 3-0, y se suturó la piel con grapadora desechable (Fig. 10F).

El suministro de sevoflurano fue interrumpido, manteniendo el animal entubado para el aporte de oxígeno y en observación hasta su completa recuperación.

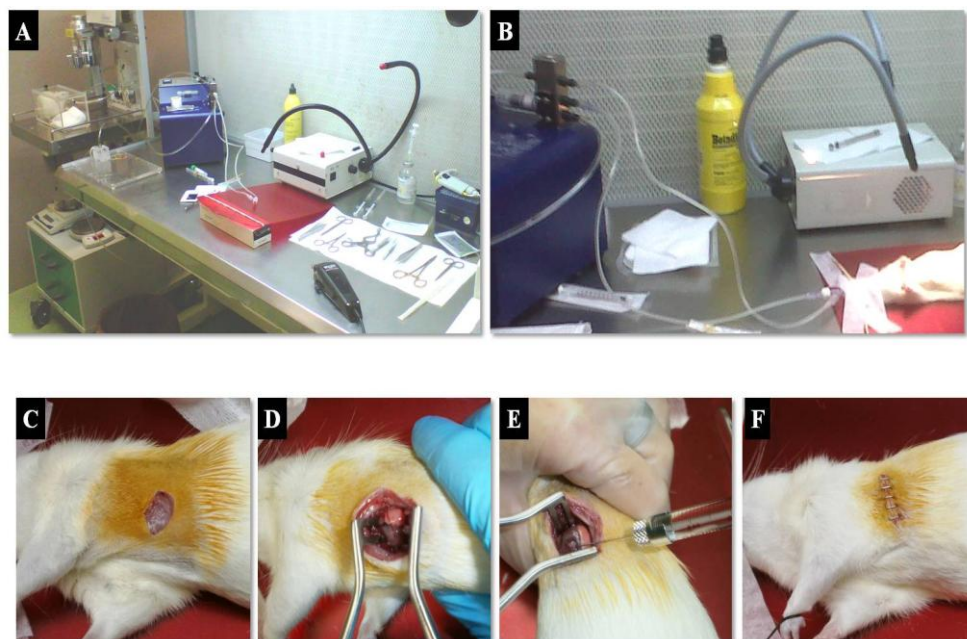


Figura 10.-Procedimiento quirúrgico para la administración del tratamiento celular o placebo por vía intramiocárdica en ratas Wistar con miocardiopatía dilatada inducida. A, Inducción de sedación en el animal y detalle de zona de trabajo. **B,** Mantenimiento del animal sedado y entubado por vía endotraqueal. **C,** Incisión inicial en el procedimiento quirúrgico. **D,** Apertura de la cavidad torácica a través del espacio intercostal con retractor Weitlaner. **E,** Inyección intramiocárdica del tratamiento celular o placebo. **F,** Sutura final del procedimiento quirúrgico.

3.3.-SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DEL TEJIDO CARDIACO

Transcurridos 28 días desde la administración del tratamiento, es decir, 70 días tras la inmunización, se dio por concluido el estudio.

Todas las ratas supervivientes (n=51) fueron eutanasiadas siguiendo las más estrictas normas éticas y legales redactadas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero.

Para el sacrificio, a las ratas se les administró una dosis de tiopental sódico ligeramente inferior a la dosis letal 50 ($L_{50} = 40\text{mg/Kg}$ de peso del animal) para conservar el latido cardiaco, y 0,02mg de Fentanilo citrato/Kg de peso del animal como analgesia, ambos por vía IP.

Confirmada la pérdida del reflejo podal en el animal, se procedió a la perfusión de solución de KCl, a una concentración de 60 mEq^{100} , a través de la abertura realizada en la cavidad torácica, por dos vías simultáneas: el ápex del corazón y la vena cava inferior, y se indujo la parada cardiaca en fase diastólica.

Se realizó una segunda perfusión con SF y una tercera perfusión con solución tamponada de paraformaldehído al 4% para fijar las células del tejido cardiaco y bloquear la autólisis de las proteínas del tejido (Fig. 11A, B y C).

Finalmente el corazón fue extirpado y sumergido en solución tamponada de paraformaldehído al 4% para la completa penetración del fijador en el tejido cardiaco (Fig. 11D).

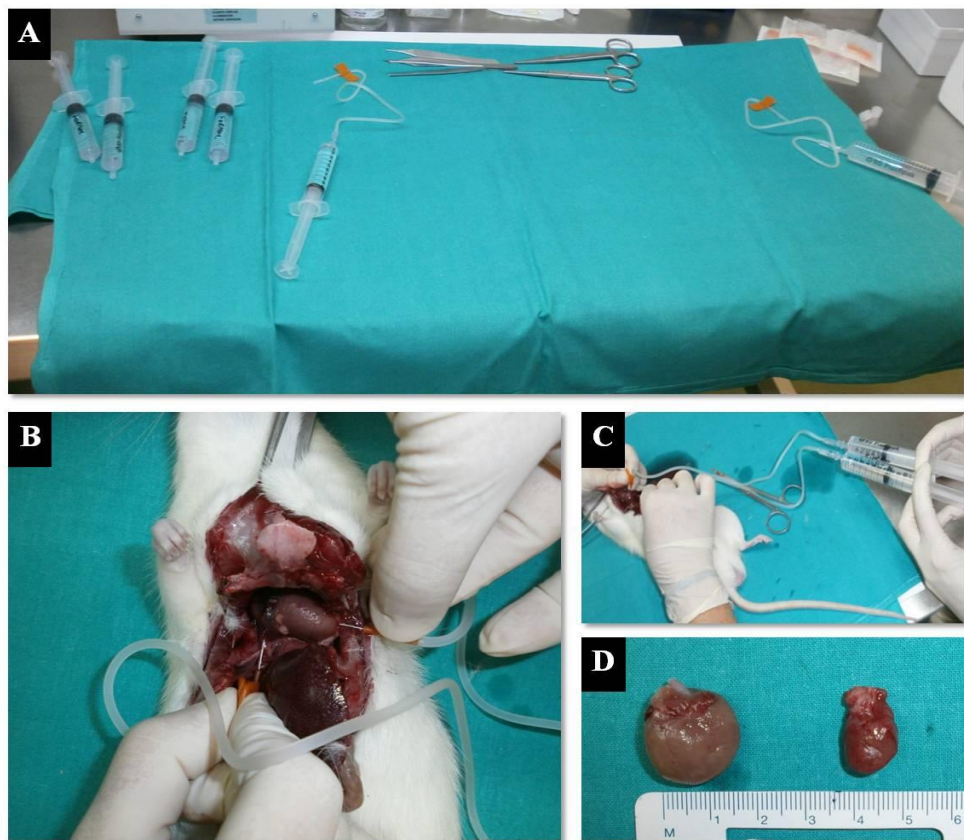


Figura 11.-Procedimiento de eutanasia en ratas Wistar macho el día +70 del estudio. A: Detalle del material. **B:** Doble perfusión a través del ápex y la vena cava del corazón. **C:** Perfusión simultánea. **D:** Comparativa de la morfología de un corazón extraído de una rata Wistar con miocardiopatía dilatada y tratada con placebo (*izquierdo en la imagen*) y de un corazón extraído de una rata Wistar sana (*derecho en la imagen*).

4.-ANÁLISIS EXPERIMENTALES

4.1.-FUNCIONALIDAD CARDIACA POR ECOCARDIOGRAFÍA

El análisis de funcionalidad cardiaca se realizó mediante ecocardiografía en todos los grupos de ratas el día 0 del estudio, el día +42 y el día +70.

Para dicho análisis se utilizó un equipo Siemens Acuson x300 Ultrasound System Release 2.0 (Siemens AG, Munich, Alemania) equipado con un transductor lineal VF13.5SP de 8,9 MHz en modo M para la adquisición de imágenes bidimensionales (Fig. 12), cedido por el Servicio de Cardiología del HURS.

Las estructuras cardíacas, atravesadas por un haz de ultrasonidos único, generan ecos cuyo movimiento en el espacio es registrado en la pantalla del equipo de forma continua, dando como resultado detalles paramétricos de la movilidad cardiaca.

Para la realización del registro ecográfico, las ratas se anestesiaron por vía INH con sevoflurano al 6%, reduciendo esta concentración a 3,5% una vez confirmada la pérdida de estación del animal.

En posición decúbito supino, se colocó el transductor de ultrasonidos sobre la pared torácica izquierda de las ratas, previamente rasurada, y se realizó el registro del engrosamiento del miocardio septal y de la pared posterior del VI a través de la disminución del diámetro final ventricular, o diámetro final sistólico (DFS), y del aumento del tamaño ventricular alcanzado al final de la fase de diástole (DFD). A partir de estos dos parámetros, se pudieron calcular patrones básicos de la dinámica cardiaca como los volúmenes finales telediastólicos (VFD) y telesistólicos (VFS), la

fracción de eyección (FE) y la fracción de acortamiento (FA) del VI a través del software del propio equipo.

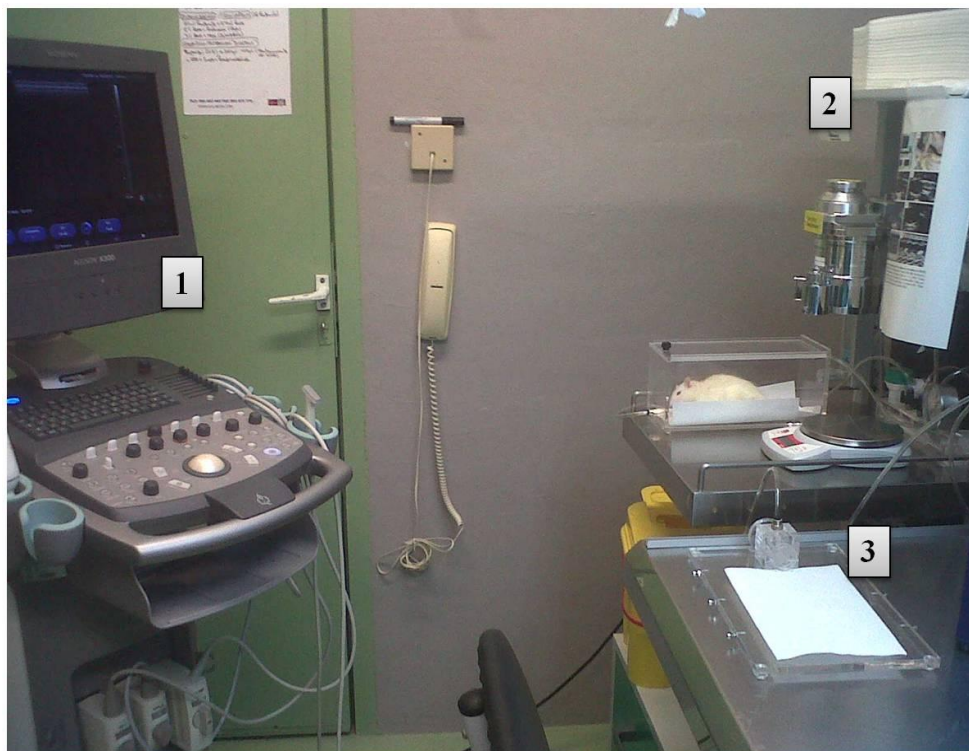


Figura 12.-Equipos y material para la realización de ecocardiografías en ratas Wistar. 1. Equipo Siemens Acuson x300. **2.** Mesa de inducción de sedación. **3.** Mesa de trabajo.

4.2.-FACTORES FISIOLÓGICOS

El registro del peso corporal (Pc) de todos los animales se realizó el día 0 del estudio y el día +70, previo al sacrificio. Para dicho registro se utilizó una báscula Ohaus® CSSeries de 0,1g de sensibilidad.

La longitud del eje transversal del corazón fue medida con un calibrador Palmer micrométrico (J.P. Selecta S.A., España) de 0,002mm de precisión y el peso del corazón (PCo) fue registrado en una balanza electrónica de precisión TP/303 (Instrument GmbH, EEUU).

A partir del PCo y del Pc de cada animal se calculó el ratio PCo respecto al Pc del animal ¹⁰¹.

$$\text{Ratio} = \text{PCo} / \text{Pc} \text{ (g} \times \text{Kg}^{-1}\text{)}$$

4.3.-FACTORES SOLUBLES EN SUERO

Los factores solubles fueron analizados en el suero de todas las ratas Wistar incluidas en el estudio.

Para la toma de muestras de sangre venosa, las ratas fueron sedadas por INH con sevoflurano al 6% y mantenida la sedación al 3,5%. La extracción de sangre se realizó con jeringa de 1mL de volumen y aguja de 0,5mm×16mm mediante punción de la vena subclavia, derecha o izquierda (Fig. 13) y se depositó en tubos Vacutainer™ (BD) con coagulante y gel. Finalizada la extracción, se interrumpió el suministro de gas anestésico permaneciendo el animal en continua observación hasta su recuperación total ¹⁰².

Para separar el suero del resto de componentes de la sangre, se realizó una centrifugación a 2000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los sueros obtenidos se alicuotaron en volúmenes de 0,3mL en tubos eppendorf y se congelaron a -80°C para optimizar la conservación de los factores solubles hasta el momento de su cuantificación.



Figura 13.-Extracción de sangre en rata Wistar. Punción de la vena subclavia.

4.3.1.-Factor de crecimiento del endotelio vascular

Para determinar la concentración sérica del VEGF se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales los días 0, +42, +43 y +70 del estudio.

La cuantificación del VEGF se llevo a cabo mediante la técnica de ELISA, utilizando el kit comercial de RayBio® “*Rat VEGF ELISA RayBiotech*”.

Para iniciar el ensayo se descongelaron las muestras de suero criopreservadas y se diluyeron 2× en diluyente. Se prepararon distintas alícuotas del VEGF recombinante (VEGFr) estándar proporcionado por el kit, desde una concentración máxima de 200pg/mL a una mínima de 0,82pg/mL. Como blanco o muestra control sin VEGF se utilizó el diluyente de las muestras proporcionado por el kit.

Todas las muestras fueron añadidas a los pocillos de la placa de ELISA se montaron por duplicado.

El procedimiento experimental se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (pto. 2.7.1).

4.3.2.-Péptido natriurético atrial tipo B

Para determinar la concentración sérica del péptido natriurético atrial-tipo B (BNP) se recogieron muestras de sangre de todas las ratas incluidas en el estudio los días 0, +42 y +70.

La cuantificación de dicho factor se realizó mediante la técnica de ELISA con el kit comercial de abcam® “*BNP 45 Rat ELISA Kit*”.

Para iniciar el ensayo, se descongelaron todos los sueros previamente criopreservados y prepararon distintas diluciones conocidas del BNP estándar proporcionado por el kit desde una concentración máxima de 1×10^{-3} pg/mL a una mínima de $0,031 \times 10^{-3}$ pg/mL. Como blanco o muestra control sin BNP se utilizó el propio diluyente de las muestras proporcionado por el kit.

Un volumen de 50µL de cada muestra se añadió por pocillo en la placa de ELISA por duplicado y se incubó para inmovilizar el BNP contenido al fondo del pocillo.

Finalizada la incubación se retiró el exceso de factor y se añadió 50µL a cada pocillo de anticuerpo secundario anti-BNP_{rat} marcado con biotina, volviendo a incubar.

Una vez retirado el exceso de anticuerpo, se añadió a cada pocillo 50µL de enzima peroxidasa HRP (HorseRadish Peroxidase) conjugada con estreptavidina y se incubó para favorecer la unión de la enzima al anticuerpo biotinilado.

Finalizada la incubación, 50µL de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno como sustratos de la enzima se añadieron a cada pocillo generando productos azulados de dicha reacción enzimática que viraron a color amarillo tras añadir ácido sulfúrico 0,2M como solución stop.

La intensidad del color de cada producto fue proporcional a la cantidad de BNP fijado inicialmente en el fondo de cada pocillo y fue cuantificada en un lector de placas Optic IVYMEN® System (Mod. 2100C) como absorbancia a $\lambda_{450\text{nm}}$.

La concentración de BNP de cada muestra de suero se calculó a través de la fórmula derivada de recta patrón obtenida de la representación gráfica de las concentraciones conocidas del BNP estándar en el eje de abscisa y el valor de sus absorbancias en el eje de ordenadas.

La concentración mínima de BNP detectable por el ensayo fue de $0,03 \times 10^{-3}$ pg/mL.

5.-ANÁLISIS MORFO-HISTOLÓGICO DEL TEJIDO CARDIACO

5.1.-PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDO CARDIACO

De los 51 corazones obtenidos de las ratas supervivientes y sacrificadas el día +70 del estudio, 39 fueron procesados para la realización de estudios morfo-histológicos por microscopía óptica ($n=11$, grupo *placebo*; $n=10$, grupo *CMNs*; $n=7$, grupo *MSCsTA*; $n=11$, grupo *MSCsMO*) y 12 corazones se procesaron para los estudios ultraestructurales realizados por microscopía electrónica de transmisión ($n=3$ por grupo).

El procesamiento del tejido cardiaco para su posterior análisis por microscopía óptica se inició con la fijación del tejido por perfusión con paraformaldehído al 4%, anteriormente descrita (pto. 3.3), y la realización en los corazones extirpados de cortes transversales seriados desde el nivel medio del VI hasta el ápex de 2mm de grosor.

Cada sección de tejido fue introducida en un cassette Slimsette[®] (Deltalab S.L. España) y procesada automáticamente en varias fases con un equipo Leica TP1020 (Leica Biosystems, Alemania) ubicado en la Unidad Experimental del IMIBIC.

En dicho procesamiento automático, el tejido fue fijado inicialmente en paraformaldehído al 4%, deshidratado con distintas soluciones de etanol en concentraciones crecientes, aclarado en xilol e incluido finalmente en parafina para darle consistencia.

Los bloques de parafina con las muestras incluidas fueron cortados en un microtomo Leica RM2125 RTS con cuchilla de acero en secciones iniciales de 20 μ m de grosor, para desbastar los bloques, y de 6-8 μ m para los cortes definitivos.

Estos cortes finos se colocaron sobre portaobjetos de cristal Deltalab® y se dejaron secar en un horno a 37°C de temperatura.

Por cada corazón extirpado se montaron cristales con preparaciones de tejido del siguiente modo: dos cristales para realizar la tinción del tejido cardiaco con Hematoxilina/eosina (H/E), 2 cristales para la tinción con tricrómico de Masson y 2 cristales para la tinción inmunohistoquímica con α -Actina de Músculo Liso (α -SMA, α Smooth Muscle Actine).

5.2.-ANÁLISIS MORFOESTRUCTURAL: TINCIÓN CON HEMATOXILINA Y EOSINA

Para realizar la tinción con los colorantes hematoxilina y eosina, las muestras de tejido cardiaco procesadas y fijadas sobre los portaobjetos de cristal se desparafinaron en xilol, se deshidrataron en distintas soluciones de etanol en concentraciones crecientes y se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina alcohólica.

A continuación, las muestras fueron rehidratadas de nuevo, aclaradas en xilol y cubiertas con medio de montaje (Dako) y cubreobjetos de cristal (Deltalab®).

La observación de las preparaciones teñidas fue realizada con el objetivo 20× en el microscopio óptico Nikon Eclipse Ci (Nikon Corporation, Tokio, Japón) ubicado en la Unidad de Terapia Celular del HURS de Córdoba.

La captura de las imágenes se realizó con la cámara fotográfica DS-Fi1 acoplada al propio microscopio y la adquisición con el software NIS-Elements versión 2.3 en formato *.tiff*.

Para el análisis de las muestras de tejido cardíaco teñidas con H/E fueron analizados los distintos elementos celulares teñidos por ambos colorantes, tanto los basófilos, teñidos de azul por la hematoxilina, como los acidófilos, teñidos en distintos tonos de rojo por la eosina.

Todas las observaciones histológicas se realizaron a ciegas y, al menos, por dos investigadores independientes.

5.3.-ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA FIBROSIS CARDIACA: TINCIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON

Para realizar la tinción con tricrómico de Masson de las muestras de tejido cardíaco procesadas y fijadas sobre portaobjetos de cristal, se utilizaron tres colorantes: hematoxilina de Weigert, para la tinción de los núcleos celulares, fucsina escarlata, para la tinción de los elementos acidófilos del tejido, y azul de anilina, para la tinción del tejido conectivo.

El exceso de colorante fue eliminado realizando varios lavados de las muestras con agua destilada para los colorantes hematoxilina y azul de anilina, y ácido fosfomolibdico al 5%.para el exceso de fucsina escarlata.

Finalizada la tinción, las muestras fueron rehidratadas, aclaradas en xilol y cubiertas con medio de montaje y cubreobjetos de cristal.

La observación de las preparaciones fue realizada con los objetivos 2× y 20× del microscopio óptico Nikon Eclipse Ci ubicado en la Unidad de Terapia Celular del HURS de Córdoba.

Las imágenes fueron capturadas en formato *.tiff* a través de la cámara fotográfica DS-Fi1 acoplada al propio microscopio para su posterior análisis morfométrico con el software NIS-Elements versión 2.3.

Tras el análisis morfométrico de las muestras de tejido cardiaco teñidas con tricrómico de Masson, se cuantificó el porcentaje de superficie de tejido cardiaco cicatricial o fibrótico respecto al total de superficie de tejido miocárdico en cada muestra mediante la fórmula:

$$[\mu\text{m}^2 \text{ de tejido fibrótico} / \mu\text{m}^2 \text{ de tejido miocárdico}] \times 100$$

De cada una de las preparaciones se adquirieron 3 imágenes. El resultado final del análisis morfométrico de cada preparación fue expresado como la media aritmética de los porcentajes obtenidos de cada imagen.

Todo el análisis histológico y las cuantificaciones realizadas en las distintas preparaciones se realizaron a ciegas y, al menos, por dos investigadores independientes.

5.4.-ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE NEOVASCULARIZACIÓN DEL TEJIDO CARDIACO: TINCIÓN CON α -ACTINA DE MÚSCULO LISO

Para el análisis inmunohistoquímico del tejido cardiaco, las muestras procesadas y fijadas sobre portaobjetos de cristal fueron teñidas con α -SMA.

Con este marcaje se cuantificó la neovascularización presente en el tejido cardiaco analizado.

El procesamiento de las muestras consistió en un desparafinado en xilol, una rehidratación en etanol, una inhibición de la peroxidasa endógena en metanol diluido en agua oxigenada, y una rehidratación en distintas soluciones de etanol en concentraciones decrecientes.

Previo a la incubación de las muestras con el anticuerpo primario anti- α SMA (Santa Cruz Biotechnology Inc, EE.UU.), a las preparaciones se les aplicó un tratamiento enzimático para bloquear la acción de las enzimas endógenas y una fase de enmascaramiento con suero normal de cabra al 10% para evitar las uniones inespecíficas.

Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario, diluido 1/200 según instrucciones del fabricante, y con el anticuerpo secundario diluido 1/50, realizando lavados intermedios para eliminar el exceso de anticuerpo no fijado.

Finalmente, las muestras se incubaron en solución reductora de fondo (Dako, Dinamarca), se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron en soluciones seriadas de etanol en concentraciones crecientes, se aclararon con xilol y se cubrieron finalmente con medio de montaje (Dako).

La observación de las preparaciones fue realizada a través del objetivo 20 \times del microscopio óptico Nikon Eclipse Ci (Nikon Corporation, Tokio, Japón) ubicado en la Unidad de Terapia Celular del HURS de Córdoba.

Para el análisis de la neovascularización del tejido cardíaco se realizó la captura de las imágenes, en formato *.tiff* a través de la cámara fotográfica DS-Fi1 acoplada al propio microscopio.

Las imágenes adquiridas fueron analizadas con el software NIS-Elements versión 2.3 realizando el recuento de capilares de pequeño calibre (diámetro capilar $\leq 25\mu\text{m}$) considerados de nueva formación y teñidos positivamente con α -SMA.

De cada muestra se adquirieron 3 imágenes correspondientes a 3 campos de alta resolución (HPF: High Power Field).

Por cada imagen, o por cada HPF, se cuantificó el número de pequeños capilares y el resultado final de cada muestra se expresó como la media aritmética de los recuentos obtenidos en el análisis de cada imagen o HPF.

Tanto el análisis inmunohistoquímico como las cuantificaciones fueron realizados de manera ciega, al menos, por dos investigadores independientes.

5.5.-ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL TEJIDO MIOCÁRDICO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las muestras derivadas de los corazones de rata extirpados el día +70 del estudio, fueron cortadas en secciones de 2mm^3 a la altura de la región media del VI.

El tejido cardíaco de estas muestras se fijó en solución tamponada de glutaraldehído al 2,5% y tetróxido de osmio al 1%, se deshidrató en distintas soluciones de etanol en concentraciones crecientes, se aclaró en óxido de propileno incluyéndolo en resina epoxi para su polimerización.

Al bloque de resina polimerizado con la muestra de tejido incluida se realizaron cortes ultrafinos de $0,1\mu\text{m}$ de grosor que fueron colocados sobre rejillas de cobre y níquel para ser contrastados con uranil saturado y citrato de plomo.

El análisis ultraestructural del tejido cardíaco procesado se realizó en un microscopio electrónico Jeol Jem 1400 (Jeol, Japón) de alta resolución ubicado en el SCAI del campus de Rabanales en Córdoba.

Para dicho análisis, las fibras cardíacas fueron clasificadas en función del grado de daño o de regeneración observado, calculando el porcentaje en el que cada tipo de fibra se presentaba en los distintos grupos de tratamiento incluidos en el estudio.

Dicho porcentaje se calculó mediante el recuento del número de fibras presentes de cada tipo, clasificadas según el grado de daño, por orificio de la rejilla de montaje. Un total de 10 orificios fueron analizados al azar por rejilla (cada rejilla está formada por una malla con 200 orificios, cuyas dimensiones son $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$).

Todas las observaciones se realizaron de manera ciega y, al menos, por dos investigadores independientes.

6.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados obtenidos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE), si no se ha indicado lo contrario.

El análisis estadístico se realizó teniendo en cuenta el tipo de muestra. Tras analizar si existía una distribución normal de los valores mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilks y debido a que el tamaño de todas las muestras fue inferior a 30 ($n < 30$) se definió un análisis estadístico no paramétrico para todos los resultados del estudio.

Las comparaciones de parámetros entre los distintos grupos de tratamiento se realizaron aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las comparaciones 2 a 2 mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Los valores basales en cada grupo respecto a los obtenidos a lo largo del seguimiento se analizaron con el test no paramétrico de Wilcoxon.

Se consideró como significación estadística un valor de $p \leq 0,05$.

Todo el análisis estadístico fue realizado con el programa informático PASW Statistic 18 (IBM SPSS).

Resultados

1.-CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTOS CELULAR

1.1.-CÉLULAS MONONUCLEADAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA

1.1.1.-Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de la población de CMNs derivadas de MO de ratas Wistar donantes (n=16) se realizó mediante la cuantificación de los marcadores de membrana CD34, CD45, CD117 y CD133 (Fig. 14), del tamaño y la complejidad media celular.

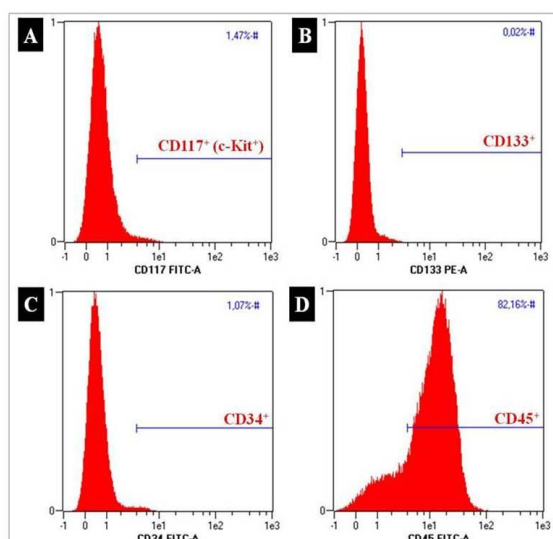


Figura 14.-Histogramas representativos de los marcadores de superficie característicos de la población de células mononucleadas. A, CD177⁺; B, CD133⁺; C, CD34⁺; D, CD45⁺.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los marcadores de superficie, del tamaño y de la complejidad media celular se representan en la tabla 1.

| Tabla1.-Análisis fenotípico de la población de células mononucleadas derivadas de médula ósea de ratas Wistar. Cuantificación por citometría de flujo. | | | | | | |
|---|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-------------|------------|
| CMNs | %CD34 ⁺ | %CD45 ⁺ | %CD133 ⁺ | % CD117 ⁺ | Complejidad | Tamaño |
| | 1,03±0,36 | 55,08±11,46 | 0,02±0,03 | 1,36±0,54 | 276,9±47,3 | 531,8±36,6 |

Los datos se representan como media±DE del grupo experimental.

En estos resultados se pudo observar cómo más del 50% de la población de CMNs presentaba el receptor CD45, característico de células hematopoyéticas.

Además se consideró representativo de esta población que el 1,03% de las CMNs analizadas expresaran el receptor CD34, propio de los progenitores hematopoyéticos, que el 0,02% de la población expresara el receptor CD133, correspondiente a células madre hematopoyéticas, y el 1,36% expresara el receptor CD117, característico de células derivadas del estroma medular. Estos resultados fueron muy similares a los descritos en la literatura ^{94,103}.

En el análisis del tamaño y la complejidad media de la población de CMNs se identificaron claramente dos subpoblaciones diferentes: monocitos y linfocitos. Ambas subpoblaciones presentaron diferencias evidentes entre ellas relacionadas con el tamaño y la complejidad media celular (Fig. 15).

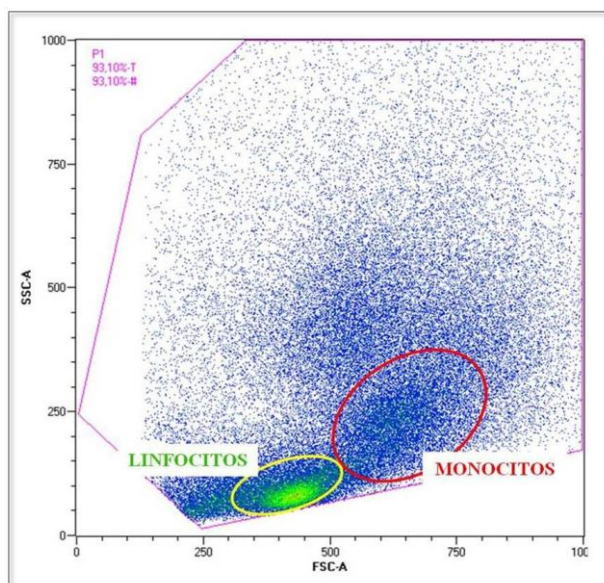


Figura 15.-Dot-plot tamaño/complejidad de la población de células mononucleadas derivadas de ratas Wistar. Principales subpoblaciones celulares identificadas: Linfocitos y Monocitos. **SSC-A:** Complejidad Celular; **FSC-A:** Tamaño Celular.

1.1.2.-Caracterización morfológica por microscopía electrónica de transmisión

En el análisis observacional del frotis celular se confirmó la integridad celular de la población de CMNs y se identificaron claramente dos subpoblaciones celulares muy diferentes morfológicamente: monocitos y linfocitos, confirmando el resultado anteriormente descrito (pto. 1.1.1) (Fig. 16A).

La ultraestructura de cada una de las dos subpoblaciones fue analizada por microscopía electrónica de transmisión mediante el análisis de las distintas muestras de CMNs (n=16) (Fig. 16B).

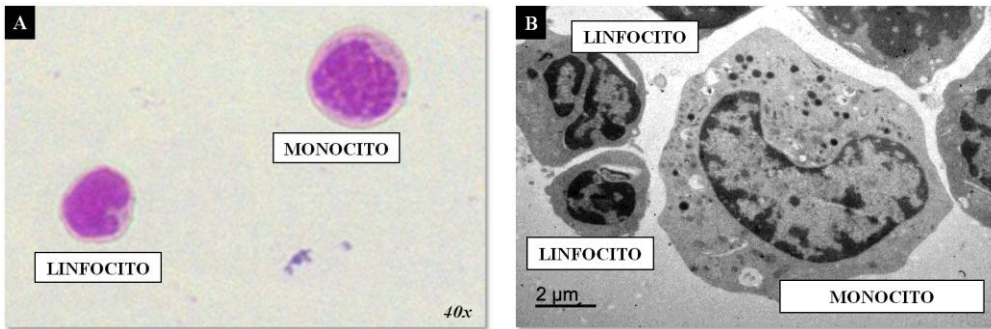


Figura 16.-Monocitos y Linfocitos de la población de CMNs de médula ósea de rata Wistar: A, Frotis celular, tinción Giemsa. Microscopía óptica. *Objetivo 40x*. B, Imagen de microscopía electrónica. *Escala 2µm*.

La mayoría de los monocitos observados presentaron un diámetro medio aproximado de 14-18µm, con una alta concentración de granulaciones en el citoplasma de dos tipos: Gránulos tipo I, localizados en el endoplasma y muy densos a los electrones como los lisosomas (Fig. 17A), y Gránulos tipo II localizados en el ectoplasma como gránulos paracrinos (Fig. 17B).

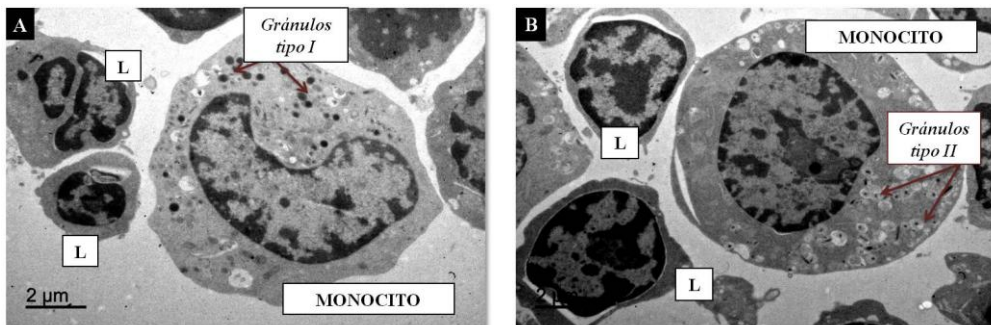


Figura 17.-Morfología nuclear y granulaciones intracitoplasmáticas de monocitos de médula ósea de ratas Wistar. A, Monocito con núcleo arríñonado y gránulos intracitoplasmáticos tipo I. B, Monocito con núcleo esférico y gránulos intracitoplasmáticos tipo II. *Escala 2µm*. L: linfocitos.

En el citoplasma celular se observaron orgánulos como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi con cisternas dilatadas y alto contenido proteico (Fig. 18A), y mitocondrias muy activas con crestas también dilatadas (Fig. 18B) debido a la gran demanda energética del metabolismo celular.

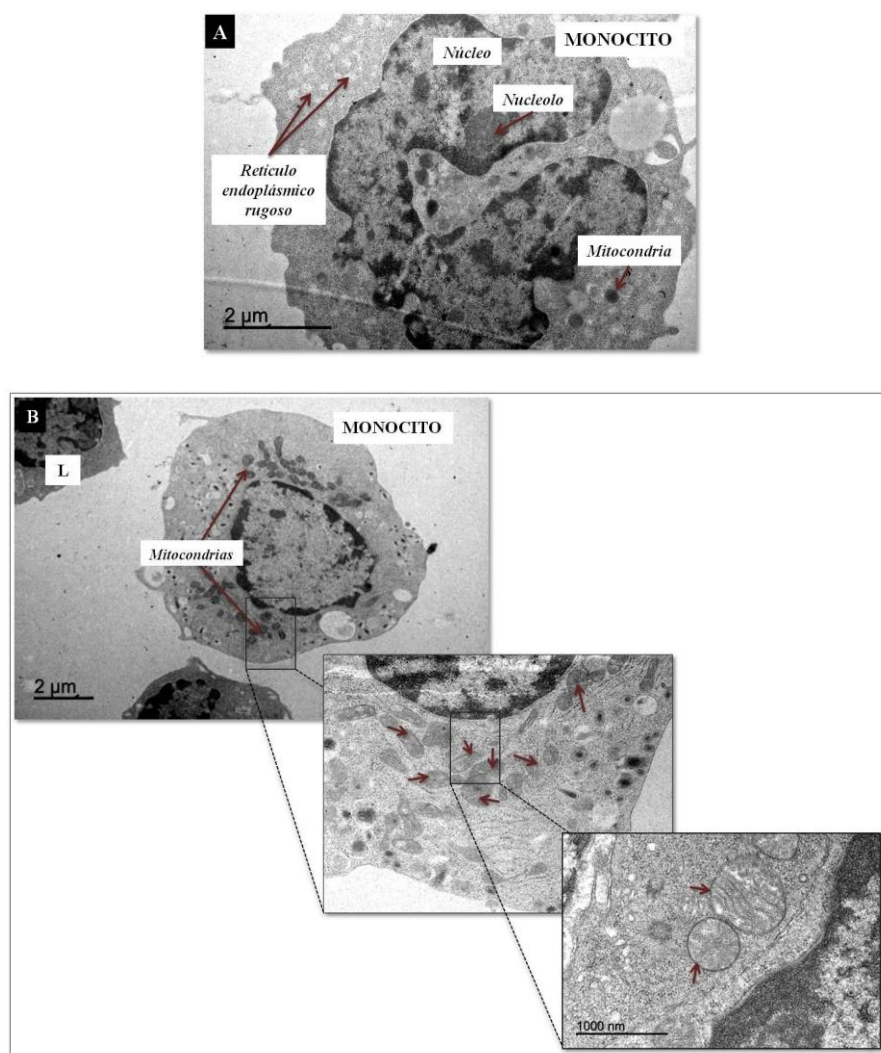


Figura 18.-Monocitos de médula ósea de rata Wistar. Detalle del citoplasma y núcleo celular: A, Núcleo arriñonado; Nucleolo; Orgánulos citoplasmáticos con cisternas dilatadas. B, Mitocondrias con crestas dilatadas. Escala 2μm. L: linfocitos

En las distintas muestras de CMNs analizadas se identificaron monocitos en división (Fig. 19A), monocitos en fase de necrosis (Fig. 19B) y monocitos hipertróficos con un diámetro aproximado de hasta 30 μ m (Fig. 19C).

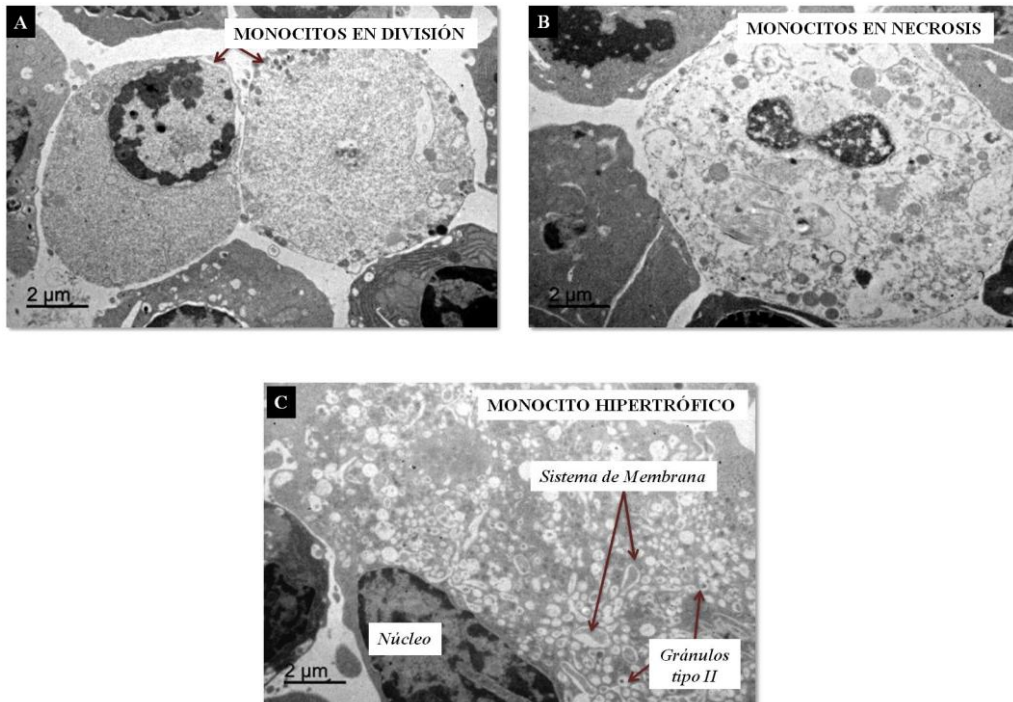


Figura 19.-Monocitos de médula ósea de ratas Wistar. A, Monocito en división. **B,** Monocito en necrosis. **C,** Citoplasma de monocito hipertrófico. *Escala 2 μ m.*

Los linfocitos observados presentaron pequeño tamaño, con un diámetro aproximado de 7-12 μ m, lo que corresponde a linfocitos inmaduros, núcleos de gran tamaño con alta concentración de cromatina muy densa a los electrones y citoplasma celular de morfología en anillo estrecho, ligeramente basófilo.

En el citoplasma se detectaron pequeños gránulos azurófilos en baja concentración y distribuidos de forma homogénea, escasos orgánulos como mitocondrias, lisosomas y ribosomas, y gránulos de glucógeno (Fig. 20).

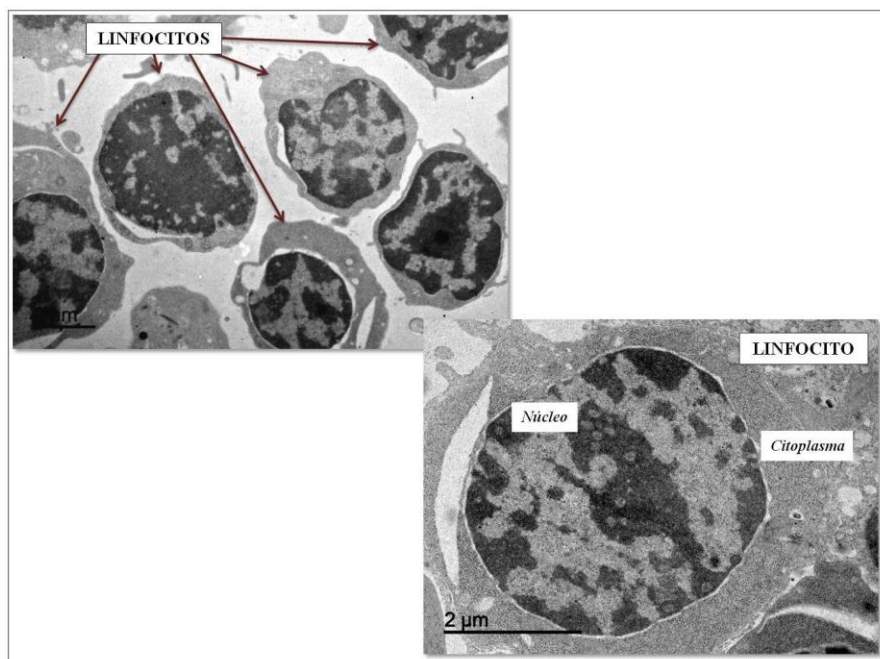


Figura 20.-Linfocitos de médula ósea de ratas Wistar. Escala 2μm.

1.2.-CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA Y TEJIDO ADIPOSO

1.2.1.-Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de la población de MSCsMO (n=17) y de MSCsTA (n=17) expandidas en cultivo a lo largo de cinco pases, se realizó mediante la cuantificación de los marcadores de membrana CD29, CD90, CD34 y CD45 (Fig. 21), del tamaño y la complejidad media celular.

Las poblaciones analizadas fueron consideradas como verdaderas poblaciones formadas por células mesenquimales si tras el análisis citométrico los marcadores CD29 y CD90 se presentaban en más del 95% de la población total analizada y los marcadores CD34 y CD45 ausentes en más del 95% de la población.

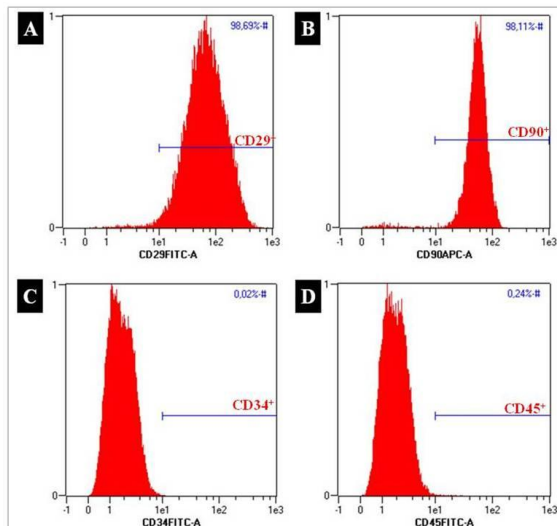


Figura 21.- Histogramas representativos de los marcadores de superficie analizados en las MSCsMO y en las MSCsTA, en los cinco pases de cultivo. A: CD29⁺; B: CD90⁺, C: CD34⁺; D: CD45⁺.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de los marcadores de superficie, del tamaño y de la complejidad media celular se representan en la tabla 2.

| Tabla 2.-Análisis fenotípico de la población de MSCsMO y de MSCsTA, derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Cuantificación por citometría de flujo | | | | | | | |
|---|---------------|---------------------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------------|---------------|
| Pases de cultivo/Tipo celular | | %CD29 | %CD90 | %CD34 | %CD45 | Complejidad | Tamaño |
| Pase 1 | MSCsTA | 98,91±1,23 | 93,27±6,15 ⁽¹⁾ | 0,05±0,04 | 0,08±0,09 | 455,1±36,8 | 476,4±58,2 |
| | MSCsMO | 92,82±8,17 ⁽¹⁾ | 87,81±12,31 ⁽¹⁾ | 0,32±0,35 | 0,37±0,34 | 418,99±69,79 | 459,0±110,0 |
| Pase 2 | MSCsTA | 99,06±0,85 | 95,94±3,03 | 0,04±0,03 | 0,07±0,06 | 433,3±213,9 | 514,2±79,1 |
| | MSCsMO | 98,04±1,58 | 97,44±2,46 | 0,018±0,04 | 0,31±0,09 | 596,1±153,5 | 521,1±45,3 |
| Pase 3 | MSCsTA | 98,71±1,29 | 96,79±6,09 | 0,03±0,03 | 0,06±0,06 | 461,3±57,5 | 541,5±35,1 |
| | MSCsMO | 94,38±5,01 | 80,62±15,79 ⁽¹⁾ | 0,09±0,09 | 0,37±0,21 | 628,9±229,5 | 367,7±17,1 |
| Pase 4 | MSCsTA | 99,24±0,60 | 98,87±0,71 | 0,03±0,02 | 0,05±0,04 | 456,3±35,5 | 589,09±33,96 |
| | MSCsMO | 96,57±2,24 | 90,14±7,99 ⁽¹⁾ | 0,26±0,03 | 0,39±0,09 | 698,7±3,5 | 412,3±18,1 |
| Pase 5 | MSCsTA | 98,46±1,11 | 97,56±1,96 | 0,02±0,02 | 0,05±0,04 | 558,0±54,8 | 622,7±72,9 |
| | MSCsMO | 97,37±2,50 | 95,40±4,38 | 0,12±0,09 | 0,41±0,02 | 773,0±44,9 | 548,1±37,4 |

Los datos se representan como media±DE de cada grupo experimental.

⁽¹⁾ No cumple los criterios de aceptación que definen a las MSCs.

En el análisis fenotípico realizado a la población de MSCsMO en todos los pases de cultivo se observó que sólo los marcadores del pase 2 (p2) y el pase 5 (p5) cumplían los criterios establecidos para considerar la población celular como mesenquimal.

Comparativamente entre ambos pases, el p2 presentaba porcentajes más próximos al 100% en los marcadores CD29 y CD90, y más próximos al 0% en los marcadores CD34 y CD45 por lo que fue considerado como el pase más homogéneo.

En el análisis fenotípico de las MSCsTA se observó que el porcentaje obtenido de los marcadores analizados cumplía los criterios establecidos en todos los pases de cultivo excepto en el pase 1.

Se realizó un análisis comparativo entre los pases que cumplían criterios y se observó que el pase 5 presentaba la población celular más compleja ($p \leq 0.048$ vs pase 3) y de mayor tamaño ($p \leq 0.026$ vs pase 2), por lo que fue considerado como el pase de cultivo más homogéneo.

En la figura 22 se representa gráficamente los resultados obtenidos de los distintos marcadores de superficie analizados, del tamaño y de la complejidad celular en ambas poblaciones celulares, MSCsMO y MSCsTA, a lo largo de los cinco pases de cultivo.

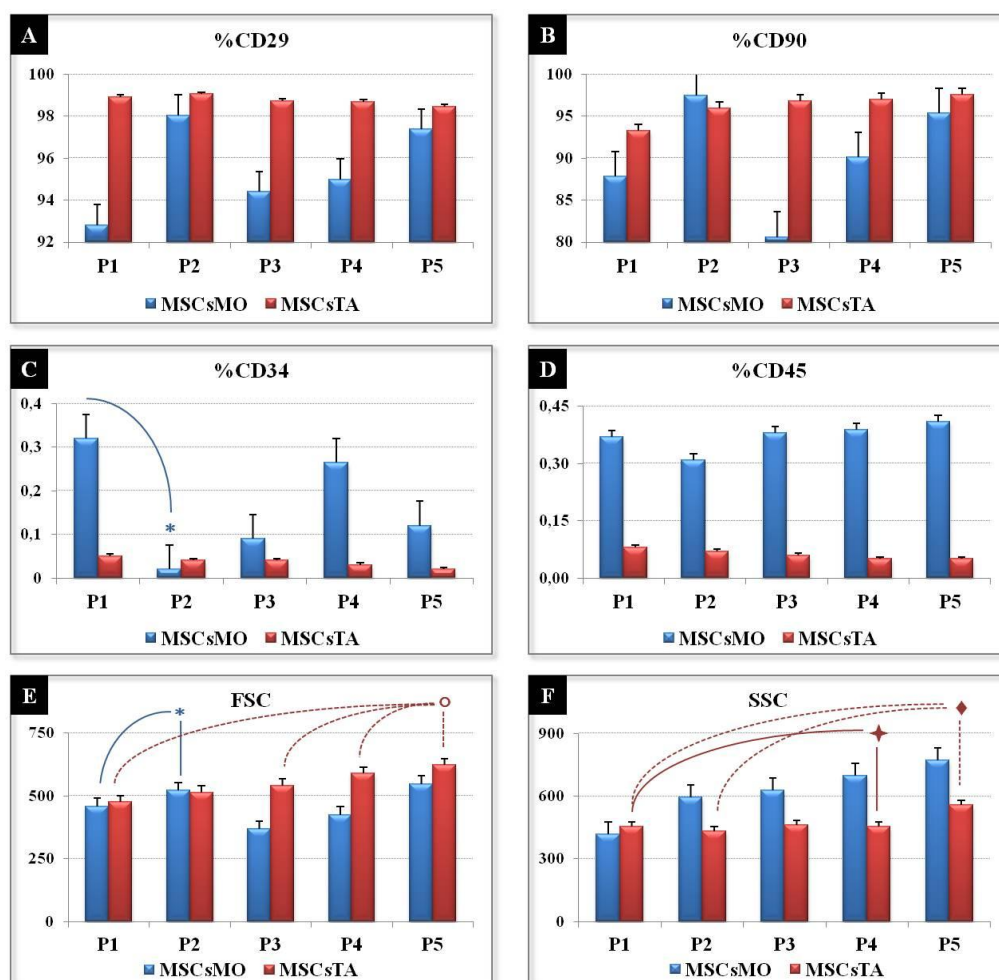


Figura 22.-Representación gráfica del fenotipo de la población de MSCsMO y de MSCsTA, de ratas Wistar. A, CD29; B, CD90; C, CD34; D, CD45. E, Tamaño celular (FSC). F, Complejidad celular (SSC). Los datos se representan como media±DE del grupo experimental. Comparaciones intra-poblacionales:

Entre la población MSCsMO:

* $p \leq 0.05$ en comparación al pase 2 de *MSCsMO*

Entre la población MSCsTA:

○ $p \leq 0.05$ en comparación al pase 5 de *MSCsTA*

★ $p \leq 0.05$ en comparación al pase 4 de *MSCsTA*

◆ $p \leq 0.05$ en comparación al pase 5 de *MSCsTA*

1.2.2.-Caracterización funcional

1.2.2.1.-Diferenciación adipogénica

La capacidad de diferenciación adipogénica de las MSCsMO (n=17) y de las MSCsTA (n=17) fue analizada en cinco pases de cultivo de un modo cualitativo en función de la capacidad de formación de vacuolas de grasa intracitoplasmáticas teñidas positivamente con el colorante Oil-Red. Las distintas muestras fueron observadas a través del microscopio Nikon Eclipse TE2000-S con el objetivo 10× y analizadas con el software de análisis NIS-Element AR 3.2.

En los resultados obtenidos de la población de MSCsMO se observó que la presencia de vacuolas de grasa en el citoplasma celular era mayor en el pase 2 respecto al resto de pases de cultivo, no observarse prácticamente vacuolas en el pase 5 de cultivo (Fig. 23).

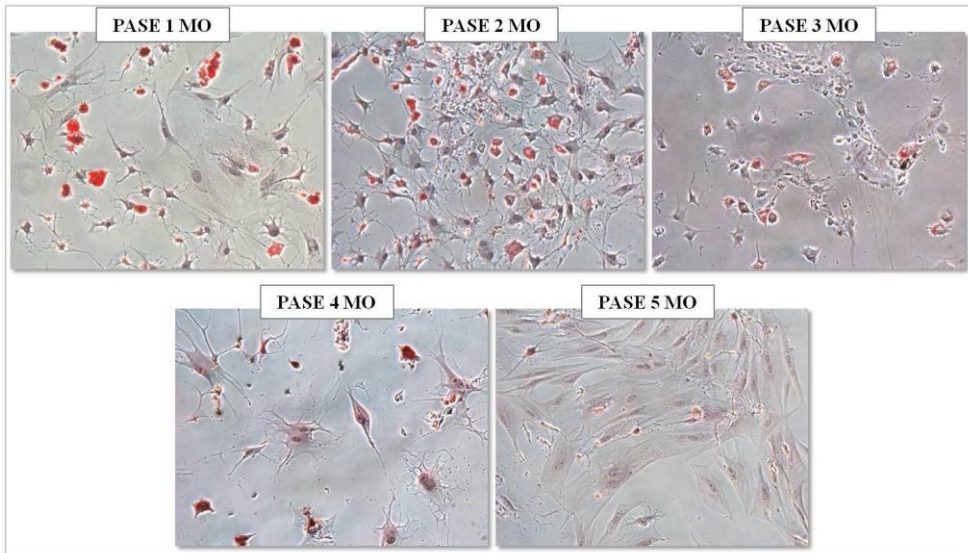


Figura 23.-Adipocitos diferenciados a partir de MSCsMO derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Objetivo 10×

Respecto a los resultados derivados del análisis de la población de MSCsTA se observó que la presencia de vacuolas en el citoplasma celular era más elevada en los pases 2 y 5 de cultivo respecto al resto de pases, siendo las del pase 5 de mayor tamaño (Fig. 24).

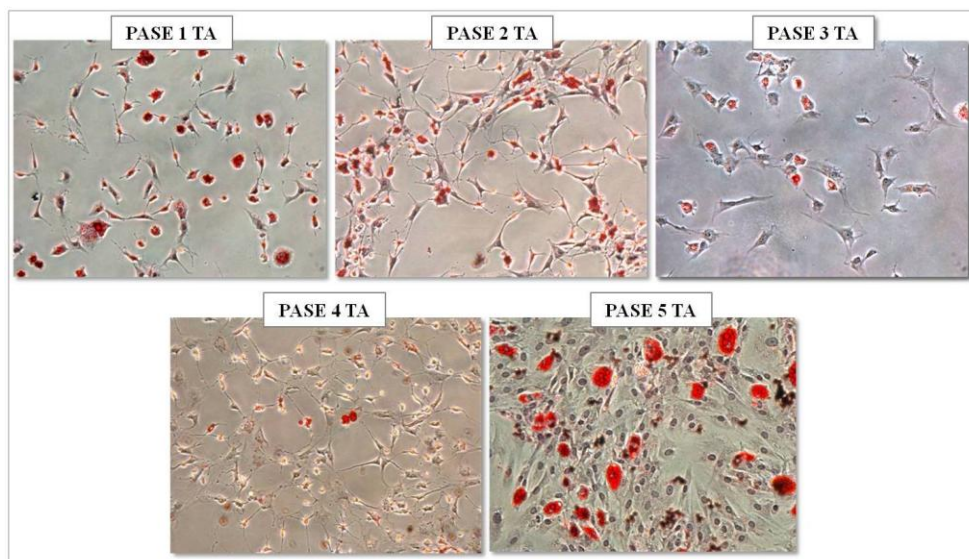


Figura 24.-Adipocitos diferenciados a partir de MSCsTA derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Objetivo 10×.

1.2.2.2.-Diferenciación osteogénica

La capacidad de diferenciación osteogénica de las MSCsMO (n=17) y de las MSCsTA (n=17) fue analizada en los cinco pases de cultivo de un modo cualitativo en función de la concentración de depósitos de Ca^{+2} extracelulares liberados por los osteoblastos diferenciados, identificados por su tinción positiva con Alizarín-Red.

Las distintas muestras fueron observadas a través del microscopio Nikon Eclipse TE2000-S con objetivo 10× y analizadas con el software de análisis NIS-Element AR 3.2.

De los resultados derivados de la población de MSCsMO se observó que la concentración de depósitos de Ca^{+2} teñidos positivamente en el espacio extracelular de los cultivos era mayor en pase 2 en comparación a la observada en el resto de pases (Fig. 25).

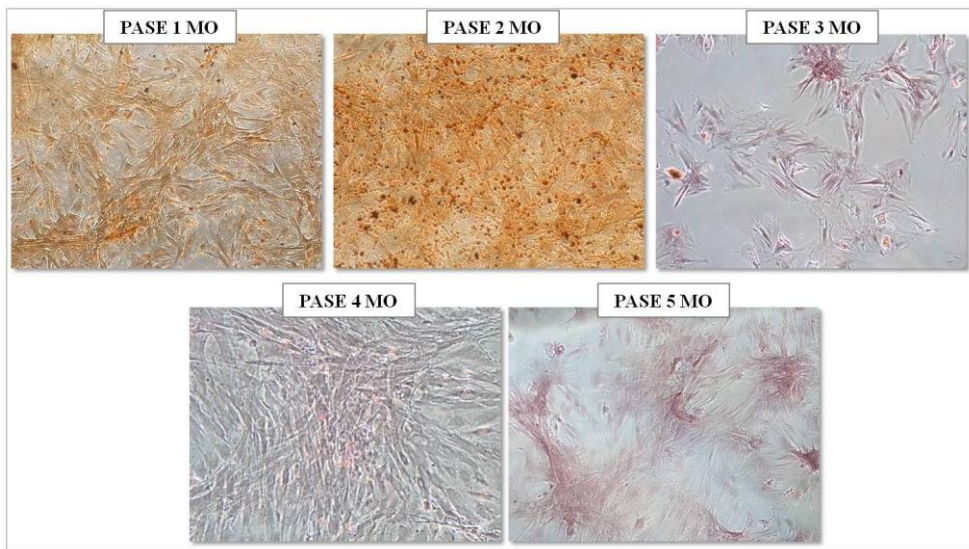


Figura 25.- Osteoblastos diferenciados a partir de MSCsMO derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Objetivo 10×.

Respecto a la población de MSCsTA se observó que la mayor concentración de depósitos de Ca^{+2} en el espacio extracelular se presentaba en el cultivo correspondiente al pase 5, respecto al resto de pases (Fig. 26).

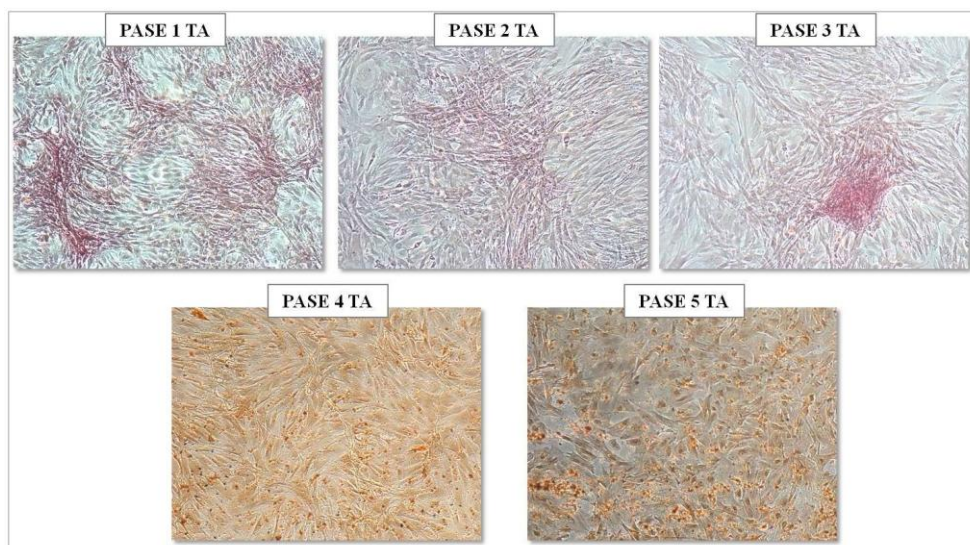


Figura 26.- Osteoblastos diferenciados a partir de MSCsTA derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Objetivo 10 \times .

1.2.2.3.-Diferenciación condrogénica

La capacidad de diferenciación condrogénica de las MSCsMO (n=17) y de las MSCsTA (n=17) fue determinada de un modo cualitativo mediante el análisis del nivel de organización ultraestructural de los componenetes de la micromasa condrocítica diferenciada a partir de las MSCs.

Las distintas micromasas fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem 1400 tras la adquisición de imágenes en formato *tiff*. con el software de microanálisis Inca energy 200 tem y Aztec incluido en el propio equipo.

Se analizaron un total de 20 imágenes de cada población celular y se realizó un estudio comparativo entre los distintos pases de cultivo de las MSCsMO y de las MSCsTA.

De los resultados derivados de la población de MSCsMO (Fig. 27) se observó que en los pases 1 y 2 el grado de desarrollo de la micromasa era muy reducido identificándose gránulos de tropocolágeno intracitoplasmático, considerados precursores del colágeno tipo III, localizado en el espacio extracelular.

Las micromasas diferenciadas a partir de las MSCs cultivadas en pase 3 presentaban células de morfología más alargada y células redondeadas con un mayor grado de diferenciación.

Las MSCsMO en pase 4 presentaron un grado de diferenciación mayor, observándose una micromasa con una evidente organización celular, con células más alargadas alojadas próximas a la periferia de la micromasa y una alta concentración de gránulos de glucógeno y retículo endoplasmático rugoso dilatado, propio de células metabólicamente muy activas, y células más redondeadas similares a condrocitos alojadas en el interior de la micromasa. Ambos tipos celulares presentaron gran concentración de vacuolas de grasa intracitoplasmáticas.

En las micromasas derivadas del pase 5 se observó claramente una organización bien definida de la micromasa con células diferenciadas a condroblastos en la zona más periférica, denominada *cambium*, y células con características morfológicas típicas de condrocitos alojadas en la zona más interna, denominada *matriz*.

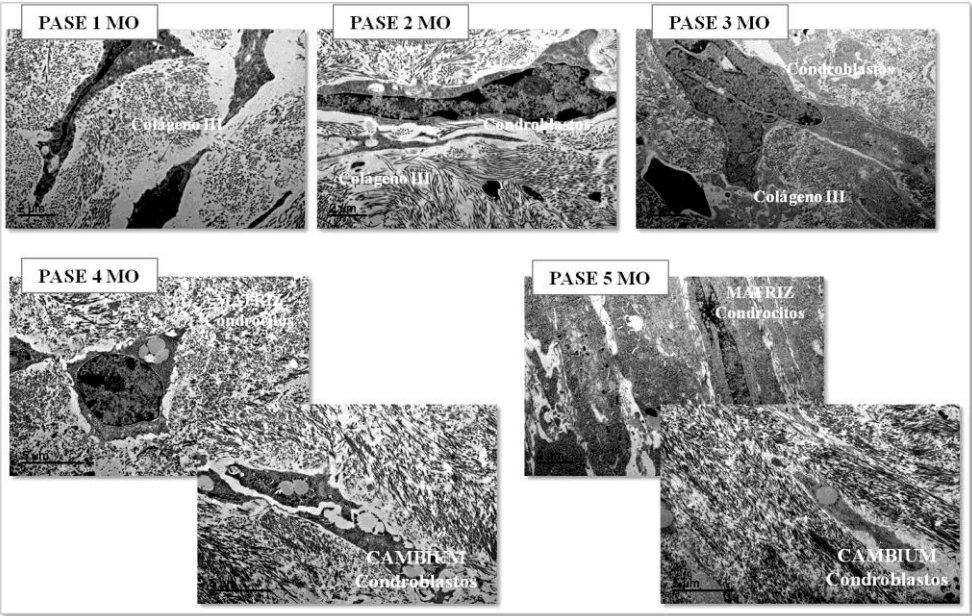


Figura 27.- Micromasas condrocíticas diferenciadas a partir de MSCsMO derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Imagen de microscopía electrónica de transmisión. Escala 2 μ m.

Respecto al análisis realizado en la población de MSCsTA en los cinco pases de cultivo (Fig. 28) se observó un nivel de diferenciación condrocítico muy reducido en el pase 1.

En las micromasas diferenciadas a partir de los pases 2 y 3 el nivel de organización fue también escaso, sin embargo se identificaron células con vacuolas de grasa, gránulos de glucógeno y retículo endoplasmático rugoso dilatado en el citoplasma.

Las MSCsTA cultivadas en pase 4 y pase 5 se diferenciaron a micromasas con un nivel de organización interno bien definido. En estas micromasas se observó un *cambium* bien organizado formado por condroblastos rodeados por fibras de colágeno

alojados en la periferia, y una matriz cartilaginosa densa formada por condrocitos maduros, alojados en el interior de la micromasa.

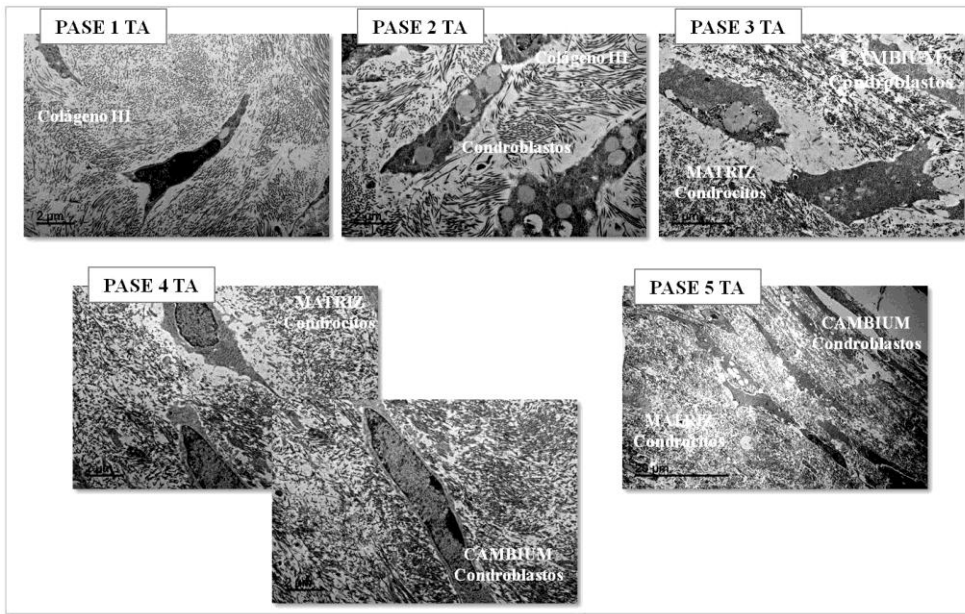


Figura 28.- Micromasas condrocíticas diferenciadas a partir de MSCsTA derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. Imagen de microscopía electrónica de transmisión. Escala 2µm.

1.2.3.-Caracterización morfológica

La caracterización morfológica fue realizada en las MSCsMOp2 (n=17) y en las MSCsTAp5 (n=17) para confirmar que, además de la homogeneidad fenotípica y funcional, también existía entre ambas poblaciones celulares una ultraestructura similar, analizada por microscopía electrónica.

Previo al procesamiento de las muestras para su análisis ultraestructural por microscopía electrónica, se realizó un frotis celular a partir del cual se pudo confirmar el perfecto estado de conservación estructural de la matriz extracelular.

Este análisis fue realizado en ambas poblaciones por microscopía óptica a 20× aumentos (Fig. 29).

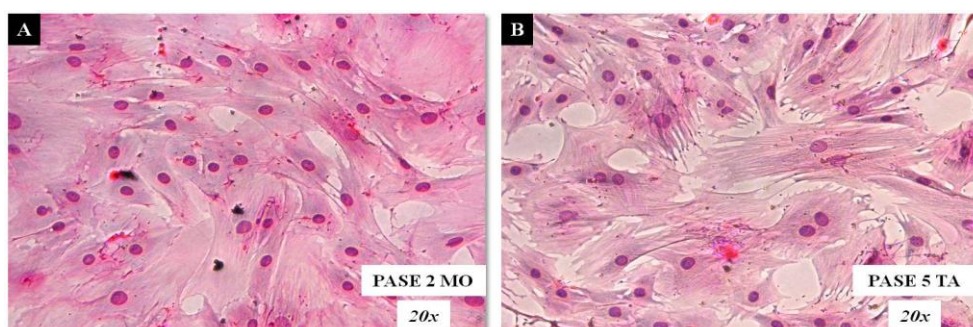


Figura 29.-Frotis celular con tinción Giemsa. A, MSCsMO en pase 2 de cultivo. **B,** MSCsTA en pase 5 de cultivo. *Objetivo 20×.*

1.2.3.1.-Microscopía electrónica de barrido

Para la caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido se seleccionaron 20 imágenes por muestra y se analizaron distintos parámetros de la estructura celular en los tres aumentos disponibles del microscopio electrónico de barrido.

Así, a 270× se analizó el tamaño celular total, incluida la matriz extracelular, a 330× se analizaron las prolongaciones celulares y uniones intercelulares, y a 600× se analizó la morfología intracelular y los nucleolos.

Como resultado de dicho análisis se observó que las MSCsMOp2 presentaban un tamaño celular menor (Fig. 30), una morfología más redondeada y prolongaciones más cortas en comparación a las MSCsTAp5 (Fig. 31).

No se observaron diferencias morfológicas respecto al tamaño de los núcleos ni de los nucléolos (Fig. 32).

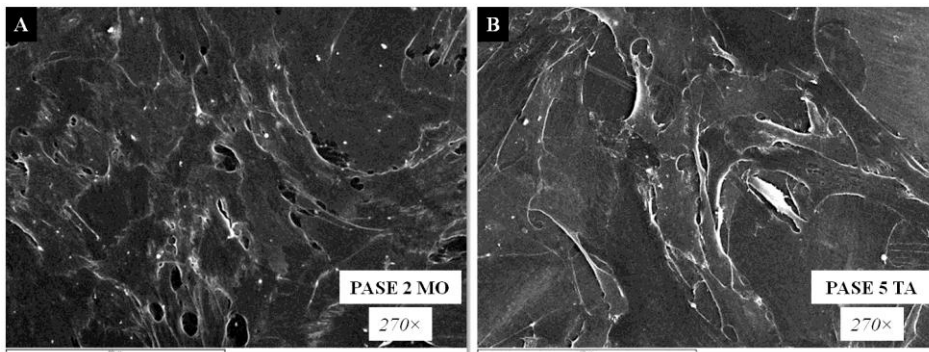


Figura 30.-Análisis de la estructura de la matriz extracelular de MSCs derivadas de ratas Wistar, por microscopía electrónica de barrido. A, MSCsMO en fase 2 de cultivo. B, MSCsTA en fase 5 de cultivo. Objetivo 270x.

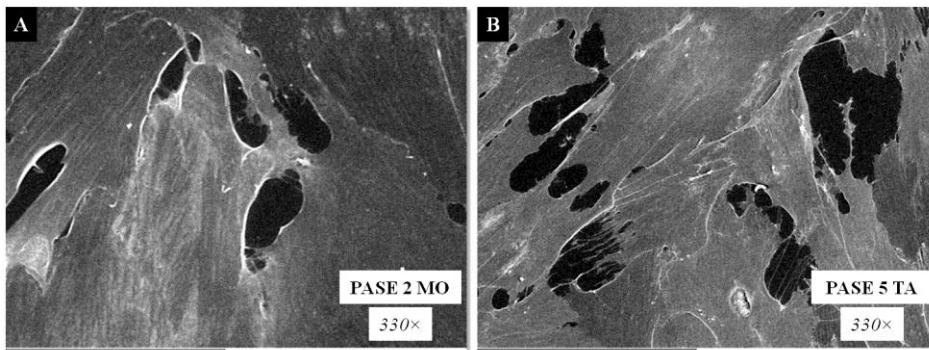


Figura 31.- Análisis de la estructura de las prolongaciones y uniones intercelulares de MSCs derivadas de ratas Wistar, por microscopía electrónica de barrido. A, MSCsMO en fase 2 de cultivo. B, MSCsTA en fase 5 de cultivo. Objetivo 330x.

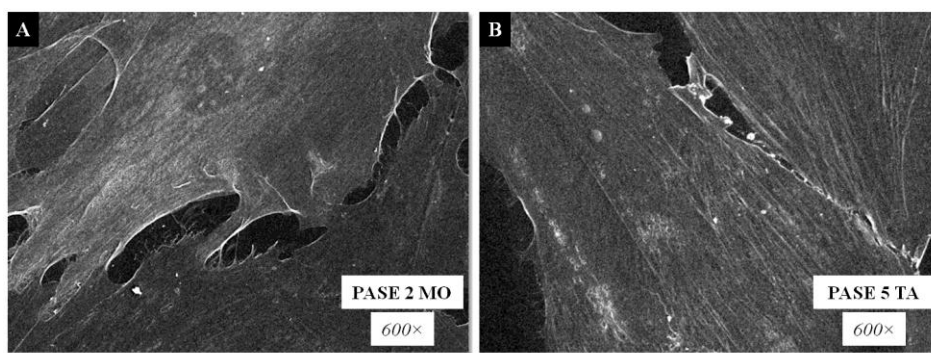


Figura 32.- Análisis de la estructura intracelular y localización de nucleolos en MSCs derivadas de ratas Wistar, por microscopía electrónica de barrido. **A**, MSCsMO en pase 2 de cultivo. **B**, MSCsTA en pase 5 de cultivo. *Objetivo 600x*.

1.2.3.2.-Microscopía electrónica de transmisión

Para caracterizar morfológicamente las MSCsMOp2 y las MSCsTAp5 se analizaron 20 imágenes por muestra.

De los resultados derivados del análisis de la población de MSCsMOp2 se observó que las células presentaban morfología esférica, gran cantidad de pedicelos ó prolongaciones adherentes en su membrana plasmática y profundas invaginaciones que aumentaban la superficie de contacto de la células con el entorno exterior favoreciendo el intercambio de señales y metabolitos (Fig. 33A).

En el citoplasma celular se observaron orgánulos distribuidos de forma regular como retículo endoplásmico rugoso, con cisternas dilatadas y alto contenido proteico, aparato de Golgi y lisosomas activos (Fig. 33B).

Los núcleos celulares de gran tamaño, entre $3\mu\text{m}$ - $7\mu\text{m}$ de diámetro, presentaban cromatina muy densa a los electrones y nucleolos visibles, características propias de células con gran actividad nuclear (Fig. 33C).

En el espacio extracelular se observaron exosomas sin gránulos de glucógeno en su interior (Fig. 33D).

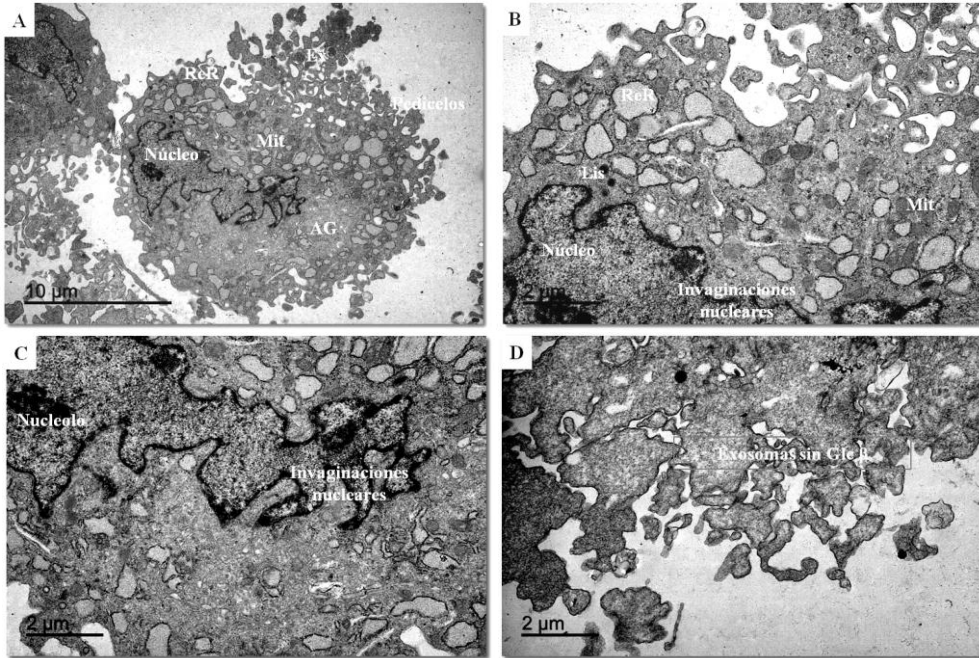


Figura 33.-Análisis de la ultra-estructura de MSCsMO derivadas de rata Wistar en fase 2 por microscopía electrónica de transmisión. A, Componentes intracelulares: mitocondrias (Mit), retículo endoplásmico rugoso (ReR), exosomas (Ex), aparato de Golgi (AG) y núcleo. *Escala 10µm. B,* Orgánulos intracitoplasmáticos: ReR con cisternas dilatadas, lisosomas (Lis) y mitocondrias (Mit). Núcleo celular con invaginaciones. **C,** Contenido nuclear: Nucleolo e invaginaciones de la membrana nuclear. **D,** Exosomas sin glucógeno β (Glc β). *Escala 2µm.*

De los resultados derivados del análisis realizado a la población de MSCsTAp5 se observó que las células presentaban un tamaño aproximado de 8µm y morfología irregular con gran cantidad de pedicelos ó prolongaciones adherentes en su membrana plasmática y núcleos que ocupaban gran parte del citoplasma (Fig. 34A).

En el espacio intracelular se observaron orgánulos distribuidos de forma poco homogénea. En el endoplasma se localizaron orgánulos como retículo endoplásmico rugoso con cisternas dilatadas, aparato de Golgi, lisosomas y gran cantidad de gránulos

de glucógeno en forma de endosomas. Estos gránulos de glucógeno, aporte energético de la célula, podrían ser excretados en forma de exosomas, muy abundantes en el espacio extracelular (Fig. 34B). En el ectoplasma se identificaron orgánulos metabólicamente menos activos como retículo endoplásmico rugoso con cisternas no dilatadas (ReR bacular) (Fig. 34C).

La membrana plasmática y la membrana nuclear presentaron gran cantidad de invaginaciones a lo largo de toda su superficie, lo que favorece el intercambio de señales y metabolitos con el espacio exterior (Fig. 34D).

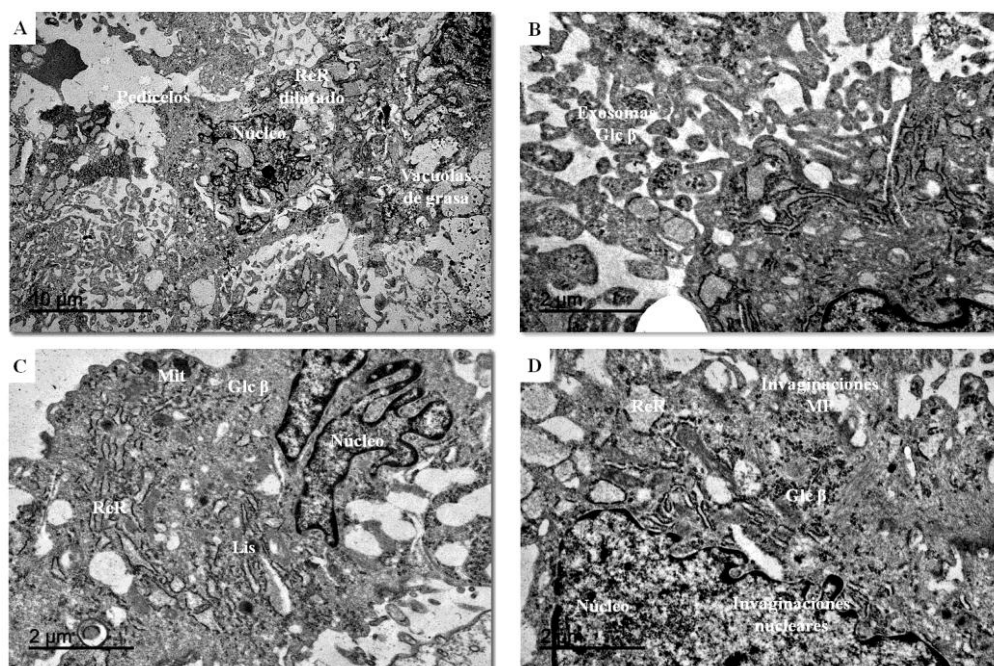


Figura 34.-Análisis de la ultraestructura de MSCsTA derivadas de rata Wistar en pase 5 por microscopía electrónica de transmisión. A, Retículo endoplasmático rugoso dilatado (ReR), vacuolas de grasa, pedicelos y núcleo celular. *Escala 10μm. B,* Exosomas con glucógeno β (Glc β). **C,** Orgánulos citoplasmáticos localizados en el ectoplasma celular: ReR, mitocondrias (Mit), gránulos de glucógeno β (Glc β) y núcleo celular **D,** Invaginaciones de la membrana plasmática y nuclear. *Escala 2μm.*

Comparativamente entre ambas poblaciones celulares, las principales diferencias ultraestructurales observadas fueron la morfología celular, más esférica en las MSCsMOp2 (Fig. 35A) y con mayor grado de compactación de la membrana plasmática, y la concentración de exosomas en el espacio extracelular, mayor en las MSCsTAp5 que además presentaron un alto contenido de gránulos de glucógeno (Fig. 35B). Otra característica diferenciadora observada entre ambos tipos celulares fueron unos gránulos intracitoplasmáticos presentes exclusivamente en las MSCsMOp2, densos a los electrones y de características similares a los gránulos observados en el citoplasma de los monocitos derivados de las CMNs, anteriormente descritos (pto. 1.1.2).

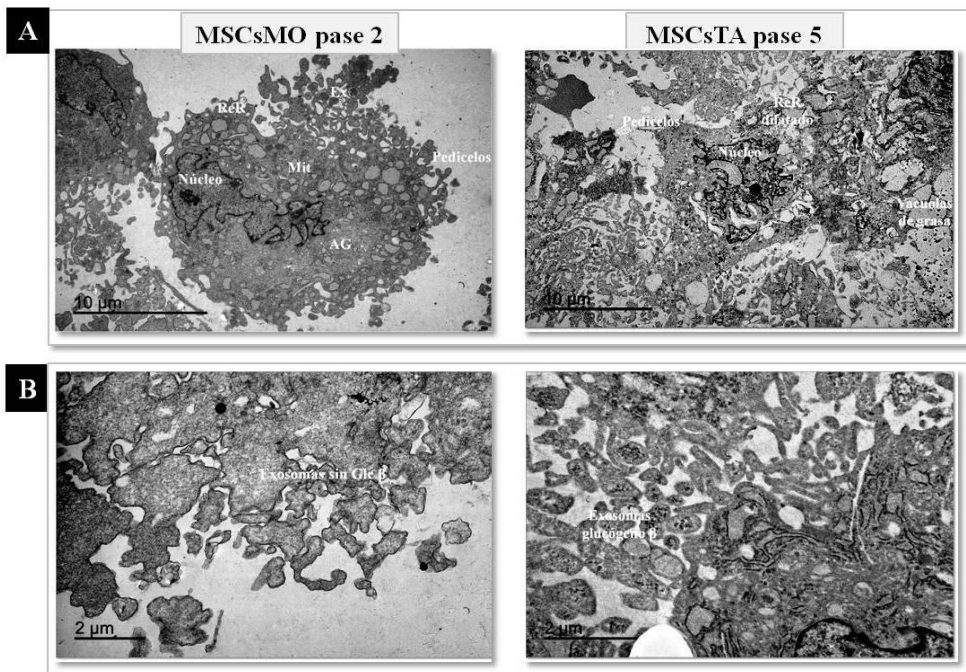


Figura 35.-Análisis comparativo de las características ultraestructurales de MSCsMO en fase 2 de cultivo y MSCsTA en fase 5 de cultivo por microscopía electrónica de transmisión. A, Morfología celular. Escala 10 µm B, Exosomas extracelulares Escala 2µm. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

1.2.4.-Cuantificación de secreción de factores solubles

Para analizar la capacidad de secreción de factores solubles de las MSCs a lo largo del tiempo se cuantificó la concentración de VEGF, FGF-2 y TGF- β 1 en el medio de cultivo en dos tiempos (T1=día +4 y T2=día+7) en cada uno de los cinco pases.

1.2.4.1.-Factor de crecimiento del endotelio vascular tipo A (*pg/mL*)

Los resultados de la cuantificación del VEGF en el medio de cultivo de las MSCsMO y de las MSCsTA se muestran en la tabla 3.

| Tabla 3.-Cuantificación de la concentración de VEGF (<i>pg/mL</i>) por 10000 células | | | | |
|---|--------------------------|-------------------|--------------------------|------------------|
| | Tiempo 1 (día +4) | | Tiempo 2 (día +7) | |
| | MSCsMO | MSCsTA | MSCsMO | MSCsTA |
| Pase 1 | 15,03 \pm 3,02 | 19,68 \pm 1,05 | 7,32 \pm 0,25 | 7,49 \pm 0,04 |
| Pase 2 | 14,24 \pm 0,25 | 18,44 \pm 0,10 | 6,76 \pm 0,01 | 9,12 \pm 0,01 |
| Pase 3 | 16,56 \pm 0,75 | 22,54 \pm 0,08 | 13,61 \pm 0,001 | 17,08 \pm 0,03 |
| Pase 4 | 8,27 \pm 0,31 | 19,07 \pm 21,13 | 10,22 \pm 0,32 | 20,06 \pm 0,22 |
| Pase 5 | 8,04 \pm 0,32 | 18,69 \pm 0,08 | 7,38 \pm 0,61 | 24,72 \pm 0,04 |

Los datos se representan como media \pm DE del grupo experimental. Valor $p=ns$.

Analizados los resultados obtenidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=ns$) en las comparaciones realizadas entre los distintos pases de cultivo de un mismo tipo de MSCs ni en las realizadas entre los derivados de fuentes diferentes (Fig. 36).

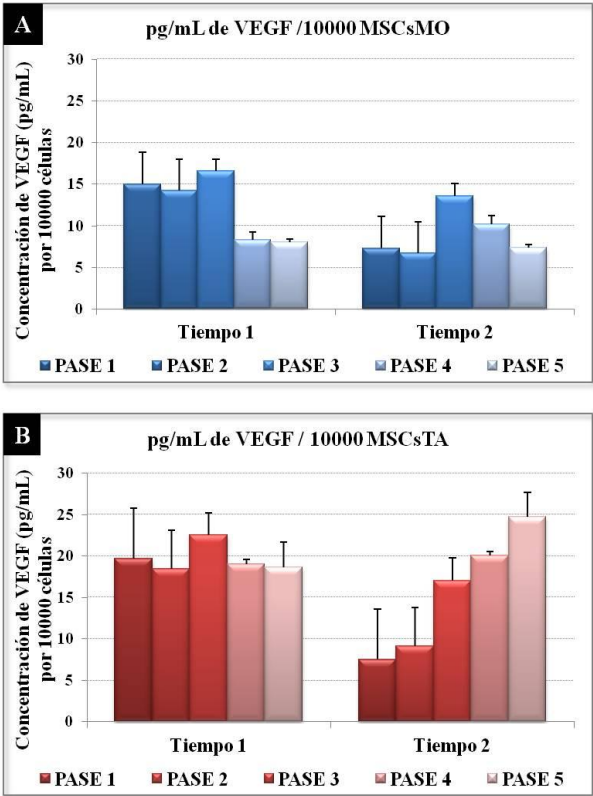


Figura 36.-Representación gráfica de la concentración de VEGF (pg/mL) a lo largo del tiempo, en el sobrenadante de MSCs derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. A, MSCsMO. B, MSCsTA. Valor $p=ns$.

Del análisis realizado destacó el resultado de la concentración de VEGF en el sobrenadante del medio de cultivo de las MSCsTA que resultó siempre mayor a la

concentración observada en el sobrenadante del cultivo de las MSCsMO, si bien, como decimos, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

1.2.4.2.- Factor de crecimiento transformante tipo $\beta 1$ (pg/mL)

Los resultados de la cuantificación del TGF- $\beta 1$ en el medio de cultivo de las MSCs derivadas de MO y de las MSCs derivadas de TA a lo largo de cinco pases de cultivo se muestran en la tabla 4.

| Tabla 4.-Cuantificación de la concentración de TGF-$\beta 1$ (pg/mL) por 10000 células | | | | |
|--|--------------------------|-------------------|--------------------------|------------------|
| | Tiempo 1 (día +4) | | Tiempo 2 (día +7) | |
| | MSCsMO | MSCsTA | MSCsMO | MSCsTA |
| Pase 1 | 105,69 \pm 4,24 | 95,66 \pm 11,74 | 33,89 \pm 1,49 | 18,69 \pm 0,07 |
| Pase 2 | 77,58 \pm 0,16 | 95,59 \pm 0,58 | 29,98 \pm 0,58 | 26,39 \pm 0,13 |
| Pase 3 | 55,77 \pm 2,21 | 79,35 \pm 2,79 | 49,74 \pm 0,07 | 33,69 \pm 0,24 |
| Pase 4 | 81,32 \pm 1,08 | 105,98 \pm 1,80 | 47,23 \pm 0,60 | 49,74 \pm 1,02 |
| Pase 5 | 92,60 \pm 1,24 | 132,07 \pm 0,45 | 41,38 \pm 3,30 | 71,94 \pm 0,20 |

Los datos se representan como media \pm DE del grupo experimental. Valor $p=ns$.

Analizados los resultados obtenidos de la cuantificación del TGF- $\beta 1$ a lo largo del tiempo no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=ns$) en las comparaciones realizadas entre los distintos pases de cultivo de un mismo tipo de

MSCs ni en las comparaciones realizadas entre las células derivadas de distintas fuentes (Fig. 37).

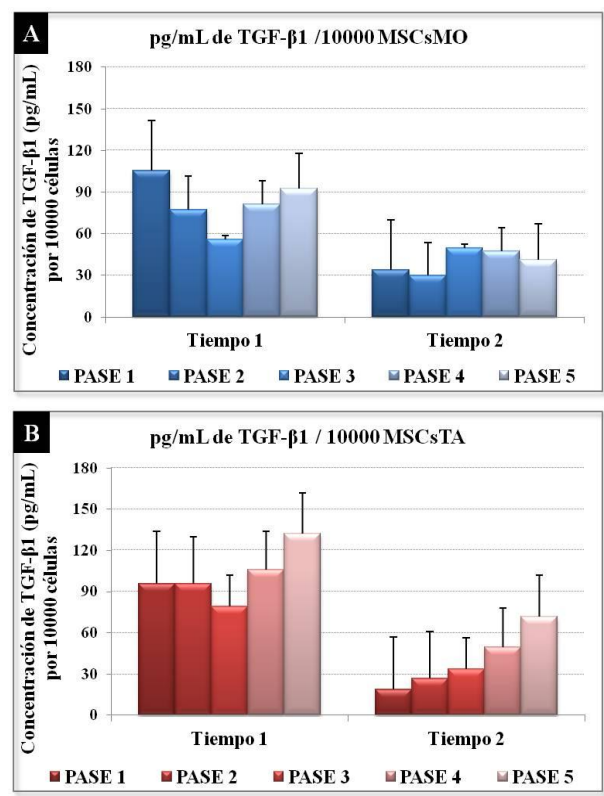


Figura 37.-Representación gráfica de la concentración de TGF-β1(pg/mL) a lo largo del tiempo, en el sobrenadante de MSCs derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. A, MSCsMO. B, MSCsTA. Valor $p=ns$.

1.2.4.3.-Factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (pg/mL)

Los resultados de la cuantificación del FGF_b en el medio de cultivo de las MSCs derivadas de MO y de las MSCs derivadas de TA a lo largo de cinco pases de cultivo se muestran en la tabla 5.

| Tabla 5.-Cuantificación de la concentración de FGF_b (pg/mL) por 10000 células | | | | |
|---|--------------------------|---------------|--------------------------|---------------|
| | Tiempo 1 (día +4) | | Tiempo 2 (día +7) | |
| | MSCsMO | MSCsTA | MSCsMO | MSCsTA |
| Pase 1 | 4,52±0,68 | 4,98±2,53 | 2,78±0,17 | 1,32±0,01 |
| Pase 2 | 7,54±0,18 | 5,76±0,27 | 3,01±0,13 | 2,81±0,01 |
| Pase 3 | 8,40±0,55 | 5,18±0,65 | 6,21±0,01 | 5,71±0,02 |
| Pase 4 | 7,42±0,35 | 15,18±0,96 | 6,49±0,21 | 8,17±0,04 |
| Pase 5 | 9,66±0,58 | 16,81±0,82 | 7,61±0,84 | 15,42±0,04 |

Los datos se representan como media±DE del grupo experimental. Valor p=ns.

Analizados los resultados obtenido de la cuantificación del FGF_b en el medio de cultivo de las MSCsMO y de las MSCsTA a lo largo del tiempo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=ns$) en las comparaciones realizadas entre los distintos pases de cultivo de un mismo tipo celular ni en las comparaciones realizadas entre ambos tipos celulares derivados de distintas fuentes (Fig. 38).

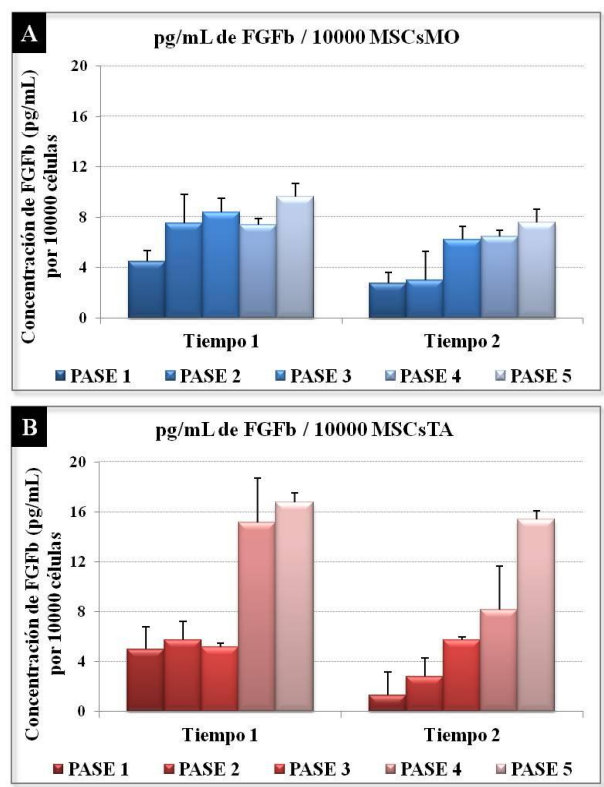


Figura 38.-Representación gráfica de la concentración de FGF_b (pg/mL) a lo largo del tiempo, en el sobrenadante de MSCs derivadas de ratas Wistar, en cinco pases de cultivo. A, MSCsMO. B, MSCsTA. Valor $p=ns$.

1.2.5.-Tasa de duplicación de cada población de MSCs

Para calcular la tasa de duplicación de cada una de las poblaciones de MSCs a lo largo del tiempo de cultivo fue necesario conocer el número inicial de células sembradas en los cultivos ($6,4 \times 10^4$ de MSCs/pocillo) y el número final de células obtenido al finalizar el tiempo de cultivo (tabla 6).

| Tabla 6.- Recuento final del número total de células mesenquimales por pocillo (<i>Volumen por pocillo=2mL</i>) | | |
|---|----------------|----------------|
| Tiempo 2: Día +7 | | |
| | MSCsMO | MSCsTA |
| Pase 1 | 20.5312±15.468 | 381.876±76.898 |
| Pase 2 | 221.666±18.856 | 234.764±70.318 |
| Pase 3 | 149.240±33.500 | 155.958±55.934 |
| Pase 4 | 155.000±8.838 | 118.126±13.258 |
| Pase 5 | 151.110±2.356 | 82.778±11.786 |

Los datos se representan como media±DE del grupo experimental. Valor p =ns.

Los resultados de la tasa de duplicación de las poblaciones celulares de MSCsMO y MSCsTA a lo largo del tiempo se muestran en la figura 39.

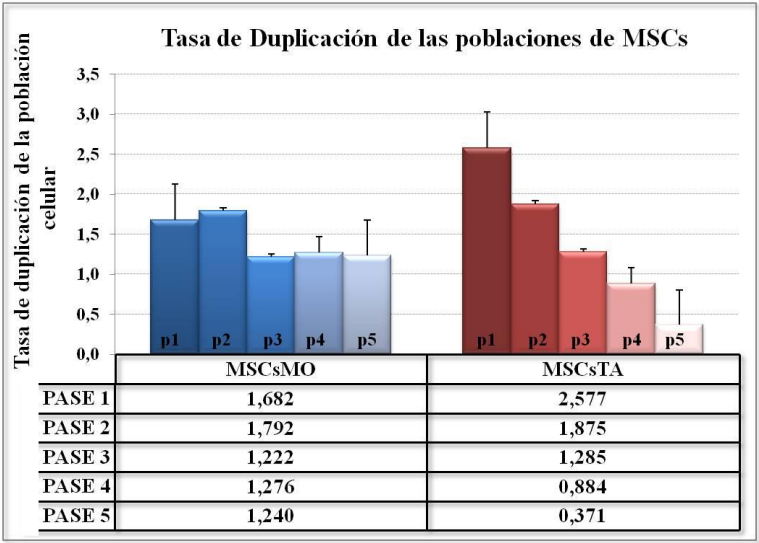


Figura 39.-Tasa de duplicación de MSCsMO y de MSCsTA tras 7 días de cultivo. Estudio realizado en cinco pases de cultivo: **p1**, pase 1; **p2**, pase 2; **p3**, pase 3; **p4**, pase 4; **p5**, pase 5. *Valor $p=ns$.*

En el análisis de los resultados obtenidos se observó que las MSCsMO duplican su población celular más de una vez ($DP > 1.0$) en todos los pases de cultivo, lo que no ocurre en las MSCsTA que sólo duplican su población en los tres primeros pases.

2.-RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL MURINO DE MIOCARDIOPATÍA DILATADA

2.1.-MODELO EXPERIMENTAL

Inicialmente, 66 ratas Wistar macho, sanas, de 8 semanas de edad, fueron randomizadas en cuatro grupos identificados como grupo Control (n=16), grupo CMNs (n=16), grupo MSCsTA (n=17) y grupo MSCsMO (n=17), y sometidas al procedimiento de inducción de MCD.

Sesenta ratas (90,9%) sobrevivieron al periodo de inducción y 6 fallecieron entre los días 21 y 28 post-inducción debido a una insuficiencia cardíaca.

El día +42 del estudio, considerado como “*punto de máximo daño*” según la literatura^{90,95,104}, las 60 ratas supervivientes habían desarrollado la enfermedad.

En la figura 40 se muestra un corazón de rata Wistar extraído el día +42 post-inducción de la MCD (Fig. 40A) y un corazón derivado de rata Wistar sana (Fig. 40B).



Figura 40.-Imágenes de corazones derivados de ratas Wistar. A, Corazón con miocardiopatía dilatada tras 42 días desde la inducción con miosina de origen porcino. **B,** Corazón sano.

El día de máximo daño, día +42, se administró el tratamiento celular ó placebo, según el grupo de estudio, por vía IM a todas las ratas incluidas en el estudio.

Durante el proceso de inyección del tratamiento se produjo la muerte de 9 animales por parada cardíaca, de los cuales uno murió durante la inyección de CMNs, seis durante la administración de MSCsTA y dos durante la administración de MSCsMO. Ningún animal murió durante la administración del placebo.

Tras la inyección del tratamiento, se continuó con el mantenimiento de los animales en continua observación hasta su sacrificio el día +70 del estudio. Ningún animal murió durante esta fase del estudio.

2.2.-ANÁLISIS DE LA FUNCIONALIDAD CARDIACA

La funcionalidad cardíaca fue analizada en todos los grupos de ratas incluidos en el estudio el día 0, previo a la inducción de la MCD, el día +42, antes de la administración del tratamiento, y el día +70.

Los resultados basales de los parámetros ecocardiográficos mostraron valores normales de la función cardíaca y una gran homogeneidad entre los cuatro grupos de estudio, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Los resultados obtenidos el día +42 y el día +70, en todos los grupos del estudio, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.-Parámetros ecocardiográficos obtenidos a lo largo del tiempo en los distintos grupos de ratas incluidos en el estudio.

| Grupo de estudio | | FE (%) | FA (%) | DFD (mm) | DFS (mm) | VFD (mL) | VFS (mL) |
|---|---------|---|---|----------|--|----------|--|
| Pre-tratamiento (Día +42) | Placebo | 58,7±7,6 | 27,5±3,4 | 8,2±0,7 | 5,9±0,8 | 1,2±0,3 | 0,5±0,2 |
| | CMNs | 61,9±5,4 | 30,2±3,6 | 8,8±1,3 | 6,2±1,1 | 1,5±0,6 | 0,6±0,3 |
| | MSCsTA | 64,1±16,7 | 32,0±12,1 | 8,2±1,7 | 5,8±1,8 | 1,3±0,5 | 0,6±0,3 |
| | MSCsMO | 54,6±5,5 | 27,7±3,1 | 8,8±0,5 | 6,3±0,5 | 1,4±0,2 | 0,6±0,1 |
| Final (Día +70) | Placebo | 60,5±9,3 | 31,0±9,2 | 7,9±1,6 | 5,6±1,7 | 1,2±0,6 | 0,5±0,3 |
| | CMNs | 65,8±5,6 | 32,5±3,5 | 8,4±1,2 | 5,7±0,9 | 1,3±0,5 | 0,5±0,2 |
| | MSCsTA | 75,1±13,7 ⁽¹⁾ | 38,9±9,4 ⁽¹⁾ | 7,6±1,6 | 5,3±1,6 | 1,1±0,6 | 0,3±0,2 |
| | MSCsMO | 79,8±11,7 ^{(2) (3)} | 45,6±9,4 ^{(2) (3)} | 6,8±1,8 | 3,8±1,5 ^{(2) (3)} | 0,8±0,6 | 0,2±0,2 ^{(2) (3)} |
| * Valor p (Comparación de resultados entre grupos el día +70 del estudio) | | ⁽¹⁾ p=0,02 ⁽²⁾ p=0,002 ⁽³⁾ p=0,003 | ⁽¹⁾ p=0,05 ⁽²⁾ p=0,007 ⁽³⁾ p=0,001 | p=0,299 | ⁽²⁾ p=0,041 ⁽³⁾ p=0,022 | p=0,313 | ⁽²⁾ p=0,036 ⁽³⁾ p=0,030 |

FE: Fracción de Eyección; **FA:** Fracción de Acortamiento; **DFD:** Diámetro Final en Diástole; **DFS:** Diámetro Final en Sístole; **VFD:** Volumen Final en Diástole; **VFS:** Volumen Final en Sístole. Los datos representan la media±DE del grupo experimental.

*Comparaciones intergrupales entre resultados del día +70 del estudio.

⁽¹⁾ Valor p vs Grupo Placebo

⁽²⁾ Valor p vs Grupo Placebo

⁽³⁾ Valor p vs Grupo CMNs

En el análisis de los resultados se observó que el día +42, post-inducción de la MCD, el 100% de los animales presentaba una reducción significativa de la funcionalidad cardíaca respecto a la observada al inicio del estudio, en condiciones basales, en todos los parámetros ecocardiográficos analizados ($p \leq 0,0018$), observándose una reducción de la FE y de la FA, y un aumento de los diámetros y los volúmenes telediastólico y telesistólico del VI.

De la comparación de los parámetros ecocardiográficos obtenidos el día +42 en los distintos grupos de ratas, resultó una gran homogeneidad entre los valores obtenidos sin diferencias estadísticamente significativas ($p=ns$).

Analizando los resultados de cada grupo de ratas referidos a los parámetros ecocardiográficos obtenidos el día +70 respecto a los obtenidos el día +42, observamos que en el grupo que recibió como tratamiento MSCsMO se produce un aumento final de la FE y de la FA, y una disminución del DFS y del VFS estadísticamente significativos ($p=0,012$) (Fig. 40).

Sin embargo, en el resto (placebo, CMNs y MSCsTA) los cambios observados en los parámetros ecocardiográficos finales no fueron significativos respecto a los suyos propios obtenidos el día +42 del estudio.

En la figura 40 se representa la evolución de cada uno de los parámetros ecocardiográficos a lo largo del tiempo en los cuatro grupos de estudio.

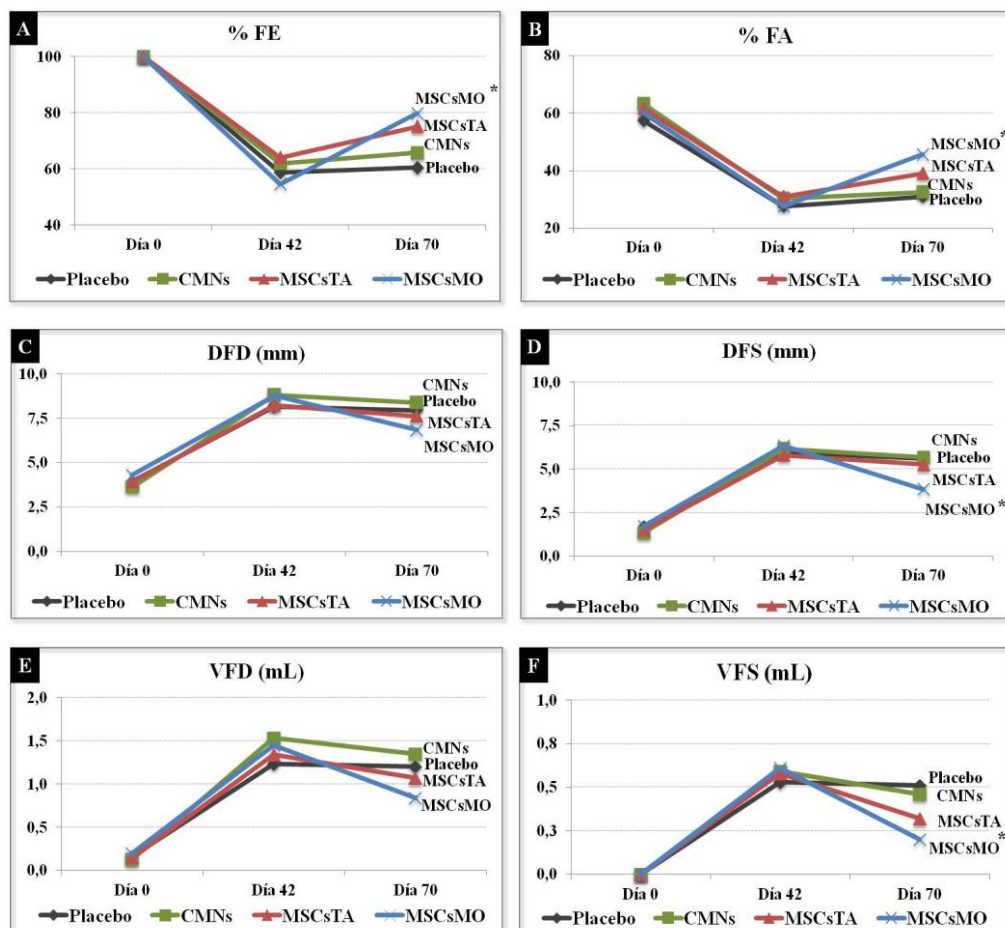


Figura 40.-Evolución de la función cardíaca a lo largo del tiempo en los cuatro grupos de estudio. FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; DFD, diámetro final diastólico; DFS, diámetro final sistólico; VFD, volumen final diastólico; VFS, volumen final sistólico.

* Valor $p < 0.05$: Variación de la función cardíaca en el grupo de ratas tratadas con MSCsMO el día +70 respecto al punto de máximo daño, día +42.

Resto de grupos: $p = ns$.

A partir de los resultados obtenidos de los parámetros ecocardiográficos, en cada grupo de ratas se calculó la variación de dichos parámetros el día +70 respecto al día +42, siendo el resultado de dicha variación la diferencia de los resultados obtenidos en cada punto.

El resultado obtenido se expresó como “ganancia funcional neta de los parámetro ecocardiográficos”, calculada en cada grupo de tratamiento.

Estos resultados se muestran en la tabla 8 y se han representado gráficamente en la figura 41.

| Tabla 8.-Ganancia funcional neta de cada parámetro ecocardiográfico en cada grupo de ratas al finalizar el estudio. | | | | |
|---|-------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Ganancia final de función cardíaca (día +70 - día +42) | Grupo Placebo (n=14) | Grupo CMNs (n=13) | Grupo MSCsTA (n=10) | Grupo MSCsMO (n=14) |
| Δ FE (%) | 1,80±4,59 | 3,83±6,86 | 11,00±7,41 * | 25,23±119,75 *† |
| Δ FA (%) | 2,73±1,65 | 3,28±4,24 | 6,92±5,28 | 17,93±16,26 * † |
| Δ DFD (mm) | -0,21±0,17 | -0,44±0,50 | -0,62±0,03 | -1,93±2,83 |
| Δ DFS (mm) | -0,35±0,42 | -0,50±0,83 | -0,55±0,15 | -2,51±3,15 |
| Δ VFD (mL) | -0,10±0,20 | -0,18±0,20 | -0,27±0,10 | -0,62±0,95 |
| Δ VFS (mL) | -0,02±0,07 | -0,12±0,17 | -0,25±0,15 | -0,40±0,47 * |

FE, fracción de eyección; *FA*, fracción de acortamiento; *DFD*, diámetro final diastólico; *DFS*, diámetro final sistólico; *VFD*, volumen final diastólico; *VFS*, volumen final sistólico. Los datos se representan como media ± DE del cada grupo experimental.

Las comparaciones han sido realizadas entre grupos de estudio:

* Valor de $p \leq 0,05$ vs Placebo

† Valor de $p \leq 0,05$ vs CMNs

Resto de valores de $p > 0,05$ (ns)

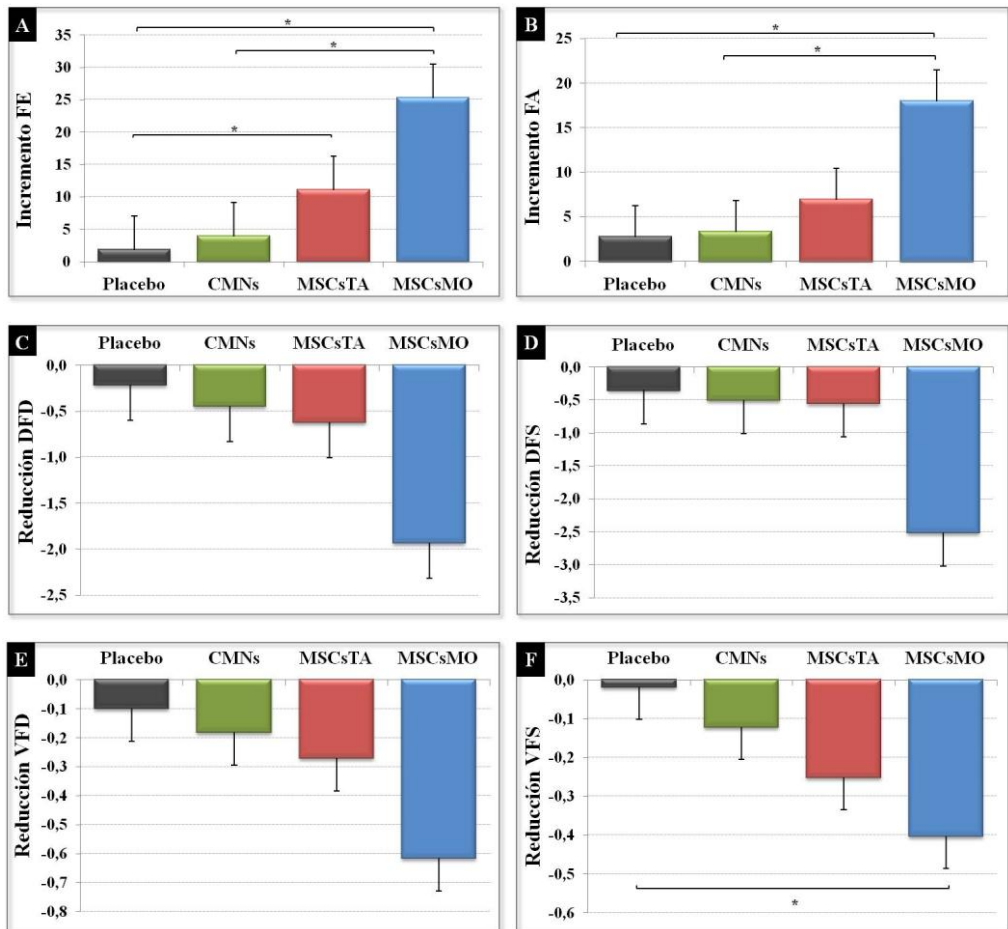


Figura 41.-Ganancia neta final de la función cardíaca. Recuperación final de la función cardíaca el día +70 del estudio respecto al punto de máximo daño, día +42. Las barras representan incremento/descenso final observado en cada parámetro ecocardiográfico. *FE*, fracción de eyección; *FA*, fracción de acortamiento; *DFD*, diámetro final diastólico; *DFS*, diámetro final sistólico; *VFD*, volumen final diastólico; *VFS*, volumen final sistólico.

* Valor de $p < 0,05$ vs grupo placebo y grupo CMNs.

El grupo en el que se observó una mayor ganancia funcional neta fue el tratado con MSCsMO, siendo esta ganancia estadísticamente significativa en comparación con la observada en el grupo tratado con placebo y con CMNs en los parámetros FE (vs placebo: $p=0,001$; vs CMNs: $p=0,005$) y FA (vs placebo: $p=0,009$; vs CMNs: $p=0,010$) y VFS (vs placebo: $p=0,030$).

La ganancia funcional neta observada en la FE del grupo tratado con MSCsTA fue significativamente superior a la observada en el grupo placebo ($p=0,050$). En el resto de los parámetros ecocardiográficos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=ns$) en este grupo de estudio.

2.3.-ANÁLISIS DE LOS FACTORES FISIOLÓGICOS

Los factores fisiológicos cuantificados en todas las ratas incluidas en el estudio fueron el peso corporal (Pc) basal, día +0, y el Pc final, día +70, una vez concluida toda la fase experimental.

La longitud del eje transversal y el peso de los corazones (PCo) extirpados fueron registrados tras el sacrificio de los animales, una vez finalizado el estudio.

Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 9.

| Tabla 9.-Resultado del análisis de los factores fisiológicos en todos los grupos de ratas incluidos en el estudio | | | | |
|--|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Factores fisiológicos | Grupo Placebo (n=14) | Grupo CMNs (n=13) | Grupo MSCsTA (n=10) | Grupo MSCsMO (n=14) |
| Peso corporal inicial(Kg) | 0,172±0,015 | 0,181±0,025 | 0,161±0,025 | 0,176±0,023 |
| Peso corporal final(Kg) | 0,283±0,024 | 0,277±0,041 | 0,299±0,018 | 0,277±0,002 |
| Incremento final del peso corporal(Kg)⁽¹⁾ | 121,33±28,98 | 100,73±20,49 | 140,12±30,58* | 108,00±27,12 |
| Peso Corazón(g) | 1,237±0,264 | 1,293±0,314 | 1,200±0,213 | 1,254±0,208 |
| Longitud transversal corazón(mm) | 11,782±1,639 | 12,001±1,976 | 12,492±1,264 | 12,293±1,704 |
| Ratio:PCo/Pc final (g/Kg) | 4,385±0,945 | 4,712±1,206 | 3,999±0,709 | 4,517±0,732 |

⁽¹⁾ Incremento final del peso corporal (Pc) de las ratas= $Pc_{final}-Pc_{inicial}$.

Los datos se representan como media ±DE del grupo experimental.

Las comparaciones han sido realizadas entre grupos de estudio:

* Valor p vs CMNs y vs MSCsMO

Resto de valores de $p>0,05$ (ns).

En el análisis del Pc inicial se observó una gran homogeneidad entre todos los grupos del estudio ($p=ns$).

El incremento final del Pc de las ratas incluidas en cada grupo, calculado como la diferencia entre el Pc final y el Pc inicial, sí presentó diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratado con MSCsTA respecto a los incrementos observados en el grupo tratado con CMNs ($p=0,006$) y con MSCsMO ($p=0,015$), no con el grupo placebo.

Los resultados obtenidos de la longitud del eje transversal del corazón y del ratio del peso del corazón respecto al peso corporal final no presentaron diferencias

significativas en las comparaciones realizadas entre los distintos grupo del estudio ($p=ns$).

2.4.-ANÁLISIS DE LOS FACTORES SÉRICOS CUANTIFICADOS

2.4.1.-Factor derivado del endotelio vascular

La concentración sérica inicial de VEGF y la concentración en el punto de máximo daño (día +42) no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los cuatro grupos de estudio ($p=ns$).

Veinticuatro horas tras la administración del tratamiento, día +43, los niveles de VEGF se incrementaron en los cuatro grupos, presentando el grupo de ratas tratadas con CMNs ($148,96\pm 29,85$ pg/mL) el máximo incremento y resultando estos niveles significativamente más altos que los observados en el resto de grupos de estudio (placebo: $72,90\pm 46,73$ pg/mL, $p=0,001$; grupo MSCsTA: $104,95\pm 32,76$ pg/mL, $p=0,011$; grupo MSCsMO: $100,00\pm 22,01$ pg/mL, $p=0,010$).

El día +70, cuatro semanas tras la administración del placebo o tratamiento celular, los niveles de VEGF en suero disminuyeron en todos los grupos.

Se observó que la concentración final de VEGF en los sueros pertenecientes a ratas tratadas con células era significativamente mayor en comparación a la concentración final del grupo placebo que fue prácticamente indetectable (grupo CMNs: $42,80\pm 34,92$ pg/mL, $p<0,0001$; grupo MSCsTA: $73,83\pm 13,53$ pg/mL, $p<0,0001$; grupo MSCsMO: $57,30\pm 28,15$, $p<0,0001$) (Fig. 42).

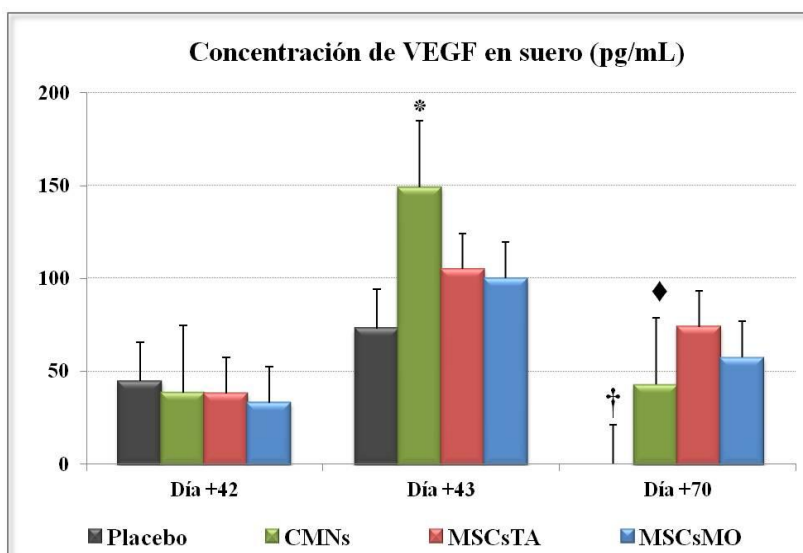


Figura 42.-Concentración de VEGF (pg/mL) en el suero de las ratas de cada grupo de tratamiento, cuantificada los días +42, +43 y +70 del estudio. Las comparaciones han sido realizadas entre grupos de estudio:

*Día +43: *Valor de $p=0,001$ vs grupo placebo*

**Valor de $p=0,011$ vs grupo MSCsTA*

**Valor de $p=0,010$ vs grupo MSCsMO*

Día +70: †Valor de $p<0,0001$ vs grupo CMNs, MSCsTA y MSCsMO

♦Valor de $p=0,008$ vs grupo MSCsTA

Finalmente, resulta interesante destacar que los niveles séricos de VEGF el día +70, a pesar de descender respecto al día +43 en todos los grupos, fueron más elevados que los obtenidos el día +42 en los grupos de ratas tratadas con MSCs pero no en los tratados con placebo ni CMNs. En estos dos grupos la concentración de VEGF se mantuvo similar o incluso inferior a la cuantificada antes de la administración del tratamiento (Fig. 43).

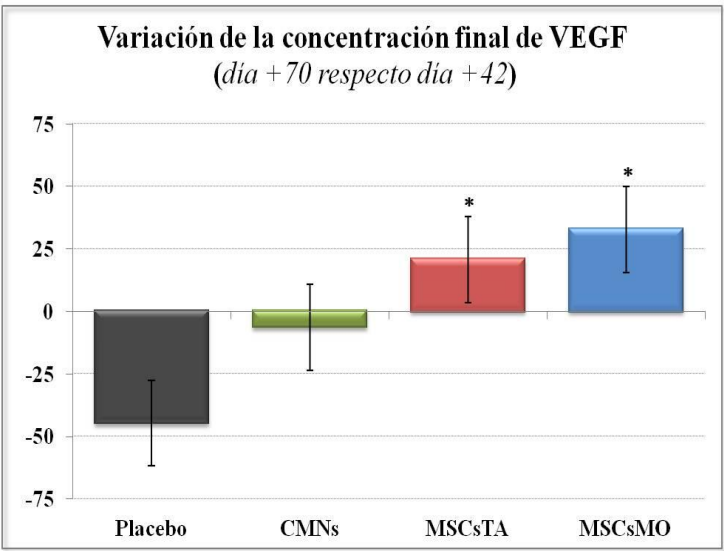


Figura 43.-Variación final de la concentración de VEGF en el suero de las ratas respecto a la concentración del día +42 del estudio.

* $p \leq 0,050$ vs grupo placebo y grupo CMNs

2.4.2.-Péptido natriurético atrial tipo B

Los niveles basales de BNP (día 0) fueron indetectables según la técnica de ELISA ($<1,66$ pg/mL).

Inmediatamente antes de la administración del tratamiento o placebo, los niveles séricos de BNP se incrementaron de manera similar en los cuatro grupos de estudio no existiendo diferencias significativas entre ellos (grupo placebo: $3,83 \pm 0,57$ pg/mL; grupo CMNs: $3,98 \pm 1,22$ pg/mL, grupo MSCsTA: $4,46 \pm 1,86$ pg/mL; grupo MSCsMO: $4,26 \pm 0,75$ pg/mL. Valor $p=ns$).

Cuatro semanas tras la administración del tratamiento, el día +70 del estudio, los niveles en suero de BNP se mantuvieron elevados en todos los grupos de ratas.

Se realizó una comparativa de la concentración final de BNP en el suero entre los distintos grupos de ratas y se observó que en el grupo placebo ($3,05 \pm 0,68$ pg/mL) y en el grupo tratado con CMNs ($2,64 \pm 0,23$ pg/mL) la concentración final de BNP fue mayor a la obtenida en los sueros de ratas tratadas con MSCs, siendo significativa esta diferencia en el caso del tratamiento con MSCsMO ($1,93 \pm 0,26$ pg/mL; $p \leq 0,05$ para ambos casos) pero no con MSCsTA ($2,30 \pm 0,59$ pg/mL) (Fig. 44).

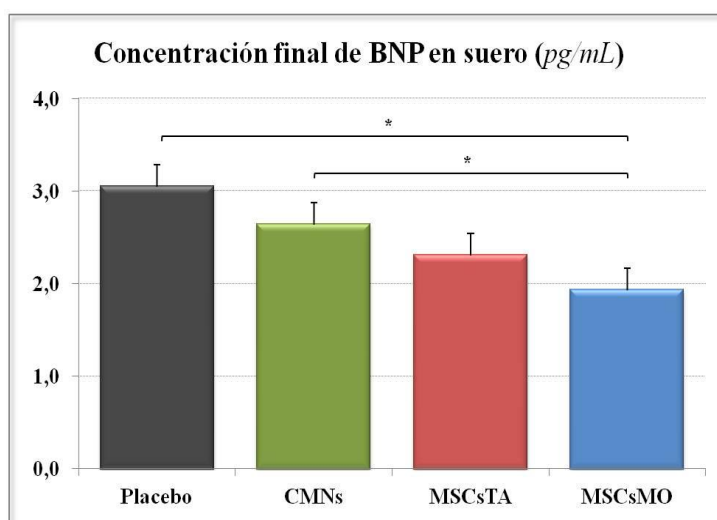


Figura 44. Cuantificación final de la concentración sérica de BNP (pg/mL). Las barras representan la media aritmética en cada grupo experimental.

* Valor $p \leq 0,05$ vs grupo placebo y grupo CMNs.

2.5.-ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO CARDIACO

De los 39 corazones derivados de las ratas sacrificadas, una vez finalizado el estudio, ($n=11$, del grupo placebo; $n=10$, del grupo CMNs; $n=7$, del grupo MSCsTA; $n=11$, del grupo MSCsMO) se procesaron y tiñieron con hematoxilina-eosina dos preparaciones por cada corazón para el análisis histológico del tejido cardiaco.

En todas las muestras analizadas se identificaron fibras con distintos grados de degeneración o de activación.

Uno de los tipos de fibras identificados fueron fibras activas (Fig. 45A), principalmente localizadas en la zona central del miocardio.

A nivel histológico, estas fibras presentaron cierto grado de pleomorfismo, bandas escaleriformes, núcleos centrales y abundantes miofibrillas con estrías transversales visibles en el sarcoplasma. El tejido conectivo intersticial, en estado edematoso, presentó abundantes capilares continuos y linfáticos, ambos con luces dilatadas.

Otro tipo de fibras detectadas fueron fibras degeneradas (Fig. 45B), localizadas principalmente en zonas del miocardio próximas al endocardio.

Estas fibras pleomórficas y de pequeño tamaño presentaron núcleos dispuestos de forma muy irregular y un contenido miofibrilar muy abundante en el sarcoplasma con estrías transversales escasamente visibles. Se observaron gruesos fascículos conectivos y vasos cicatriciales envolviendo a estas fibras degeneradas.

Otro tipo de fibras identificadas fueron fibras en necrosis (Fig. 45C) localizadas en el miocardio principalmente en las proximidades del pericardio.

Estas fibras pleomórficas de pequeño tamaño presentaron núcleos basófilos pequeños, dispuestos de forma irregular, con miofibrillas poco visibles en el sarcoplasma y signos evidentes de necrosis. Además la disposición de las fibras en pequeños acúmulos,

envueltas por tejido cicatricial, aportaba a las fibras un aspecto amorfo, proceso conocido como necrosis por coagulación.

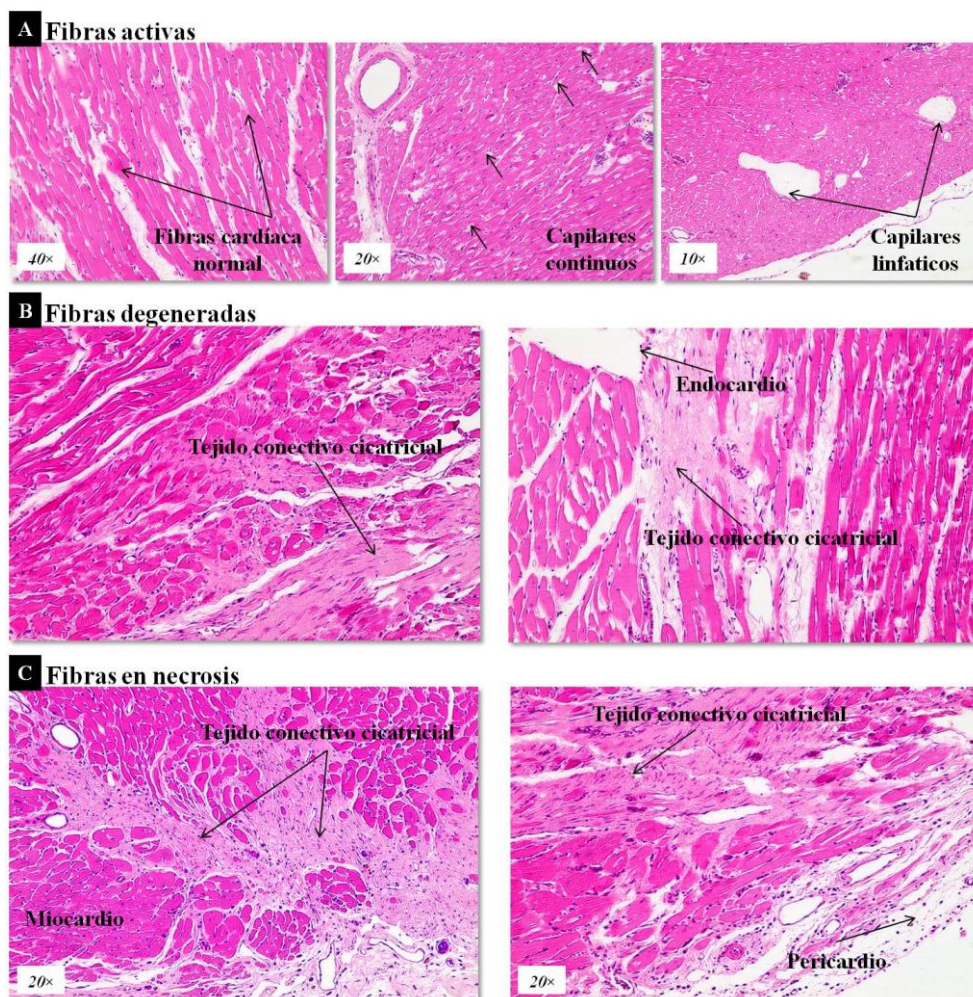


Figura 45. Tipos de fibras cardíacas identificadas en función de su estado de conservación morfológica. A, Fibras activas: bandas escaleriformes, visibles a 40× aumentos; alta concentración de capilares continuos, visibles a 20× aumentos; capilares linfáticos, visibles a 10× aumentos. **B, Fibras degeneradas:** tejido conectivo cicatricial en la zona del endocardio, 20× aumentos. **C, Fibras en necrosis:** alta concentración de tejido conectivo cicatricial en el miocardio, visible a 20× aumentos. *Tinción Hematoxilina-Eosina.*

Un tipo muy especializado de fibra identificada en las distintas muestras de tejido miocárdico analizadas fueron las fibras de Purkinje, localizadas en el subendocardio.

También fueron identificadas áreas de cicatrización, próximas al endocardio y al epicardio, en las que destacó la presencia de tejido de granulación y amplios fascículo de fibras de colágeno que comprimían las fibras cardíacas y los vasos neoformados.

Entre los cuatro grupos de estudio se observaron diferencias respecto al tipo de fibra predominante.

Así, en las muestras de tejido miocárdico del grupo de ratas tratadas con placebo se observaron fibras en distintos grados de alteración, amplias zonas de cicatrización localizadas principalmente en el endocardio y epicardio y zonas de granulación con amplios fascículo de fibras de colágeno que comprimían las fibras cardíacas y los vasos neoformados (Fig. 46A).

En el grupo de ratas tratadas con CMNs la presencia de fibras en necrosis y de fibras degeneradas, localizadas principalmente en las proximidades del endocardio y del pericardio fue reducida.

Las fibras activas, pleomórficas e hipertrofiadas, principalmente distribuidas en el miocardio, fueron abundantes. Estas fibras presentaron núcleos centrales, abundantes miofibrillas con evidentes estrías transversales, discos intercalares localizados tanto en las zonas adelgazadas como en las engrosadas de las fibras y un fino armazón conectivo alrededor de las fibras con capilares sanguíneos. Estas características de las fibras activas, la evidente reducción de tejido cicatricial fibroso, la alta concentración de meta-arteriolas neoformadas y la presencia de fascículos y nódulos de fibras de

Purkinje aparentemente normales en la zona subendocárdica del tejido cardíaco correspondían a un tejido en recuperación (Fig. 46B).

En el grupo de ratas tratadas con MSCsTA se observaron fibras cardíacas de características similares a las observadas en el grupo placebo aunque era más evidente la disminución de fibras degeneradas y necróticas.

La presencia de fibras activas fue más elevada, comparativamente con el grupo placebo, ocupando la mayor parte del miocardio. Estas fibras presentaron un gran pleomorfismo, núcleos centrales y elementos contráctiles en desarrollo evidenciándose estrías transversales y discos intercalares en las zonas más adelgazadas de las fibras. Se observó una reducción del tejido cicatricial y de los capilares linfáticos respecto al grupo placebo y se apreciaron fascículos de fibras de Purkinje de morfología normal en la zona subendocárdica. Estas características se correspondían con un tejido cardíaco en recuperación, con alta concentración de tejido conectivo que podría afectar a la funcionalidad de las fibras activas (Fig. 46C).

El grupo de ratas tratadas con MSCsMO presentó una mayor recuperación del miocardio con una evidente reducción del tejido cicatricial.

No se apreciaron fibras con signos de necrosis y fueron muy escasas las fibras en vías de degeneración. Las fibras activas ocupaban prácticamente todo el miocardio y sólo en zonas muy concretas del miocardio, próximas al endocardio y al epicardio, se localizó tejido cicatricial con un reducido número de vasos sanguíneos.

Las fibras activas hipertrofiadas, sin signos de pleomorfismo, presentaron varios núcleos en posición central, miofibrillas bien desarrolladas en el sarcoplasma cuya disposición hacía muy evidentes las estrías transversales y los discos intercalares en las caras laterales de las fibras.

En el tejido intersticial se observó una neovascularización digna de citar con abundantes arteriolas y metaarteriolas acompañadas de capilares linfáticos de grandes proporciones.

La disposición en fascículos de las fibras de Purkinje, localizadas en la zona subendocárdica fueron también signos evidentes de la recuperación del tejido cardiaco analizado (Fig. 46D).

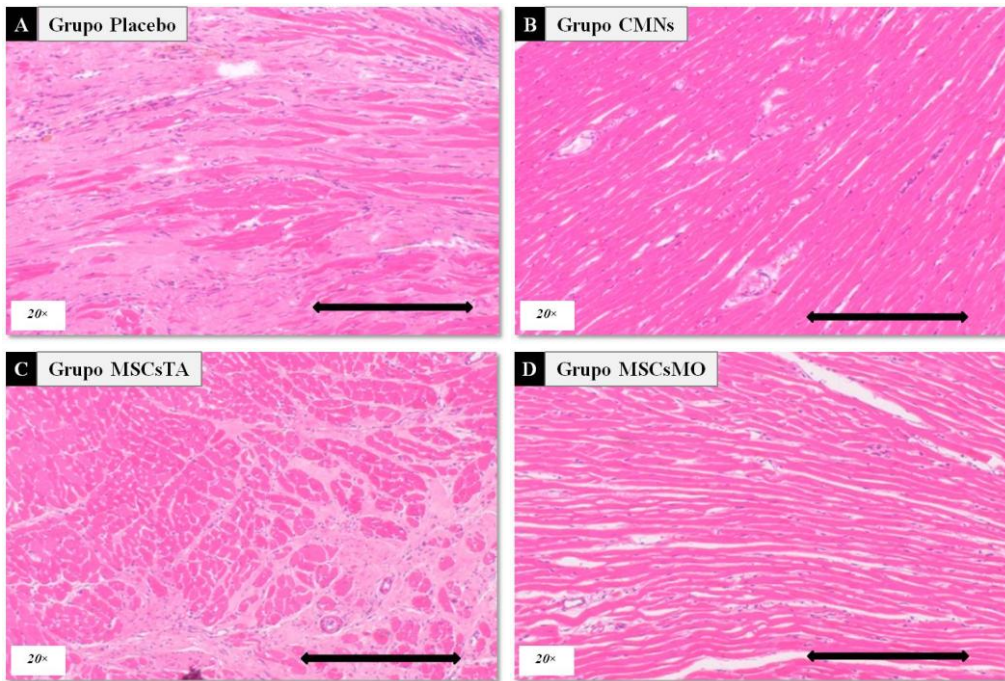


Figura 46.-Análisis del tipo de fibras cardiacas en las muestras de tejido miocárdico de cada grupo de estudio: A: Grupo placebo. **B:** Grupo CMNs. **C:** Grupo MSCsTA. **D:** Grupo MSCsMO. *Imágenes de microscopía óptica. Objetivo 20×. Escala 100µm. Tinción Hematoxilina-Eosina.*

2.6.-ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA FIBROSIS CARDIACA

De los 39 corazones derivados de las ratas sacrificadas, una vez finalizado el estudio, ($n=11$, del grupo placebo; $n=10$, del grupo CMNs; $n=7$, del grupo MSCsTA; $n=11$, del grupo MSCsMO), fueron procesadas y teñidas con tricrómico de Masson dos preparaciones por cada corazón para el análisis morfométrico de las fibras de colágeno contenidas en el tejido cardiaco (Fig. 47A).

En dicho análisis se observó que el porcentaje de colágeno en las muestras de tejido cardiaco pertenecientes al grupo de ratas tratadas con MSCsMO ($0,009\pm0,01\%$ de colágeno) fue significativamente menor al obtenido en el resto de grupos incluidos en el estudio ($p\leq0,050$).

El grupo de ratas tratadas con CMNs presentó un porcentaje de fibras de colágeno en el tejido miocardiaco inferior al obtenido tanto en el grupo placebo y en el grupo MSCsTA, sin diferencias significativas. En ambos grupos, tanto el placebo como el tratado con MSCsTA, el porcentaje de colágeno fue muy similar (grupo CMNs: $0,333\pm0,10\%$; grupo MSCsTA: $2,071\pm2,00\%$; grupo placebo: $2,772\pm1,10\%$. Valor $p=ns$) (Fig. 47B).

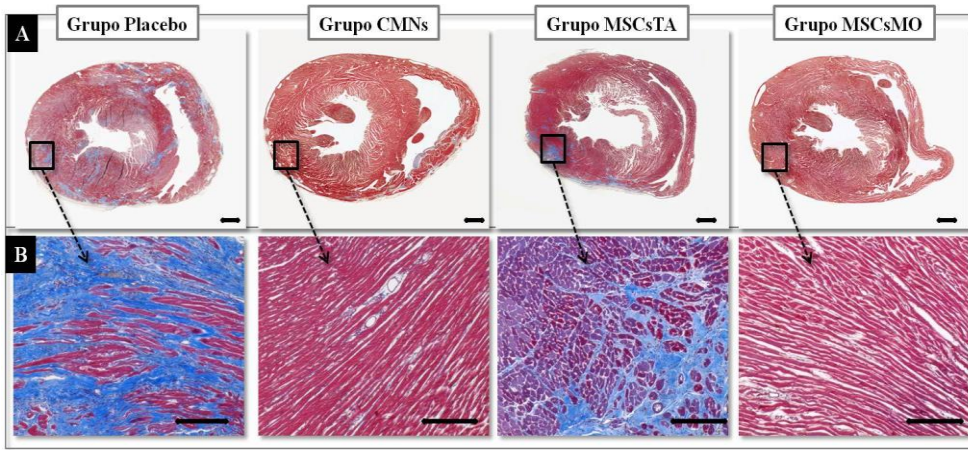


Figura 47.-Tinción de muestras de tejido cardíaco con tricrómico de Masson para análisis morfométrico. A, Sección transversal completa de corazón de rata Wistar: *Composición final realizada a partir de 16 imágenes capturadas con objetivo 4×. Escala 500μm.* **B,** Detalle de fibras de colágeno, teñidas con colorante azul de anilina, en el tejido cardíaco de cada grupo del estudio. *Objetivo 20×; Escala 100μm.*

2.7.-ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DEL TEJIDO CARDIACO DE NEOVASCULARIZACION

De los 39 corazones derivados de las ratas sacrificadas, una vez finalizado el estudio ($n=11$, del grupo placebo; $n=10$, del grupo CMNs; $n=7$, del grupo MSCsTA; $n=11$, del grupo MSCsMO), se procesaron dos preparaciones por cada corazón para el marcaje inmunohistoquímico con α -SMA.

Este análisis inmunohistoquímico permitió el recuento de vasos de pequeño calibre (diámetro $\leq 25\mu\text{m}$) como estimación de la neovascularización del tejido cardíaco tras la administración de los distintos tratamientos (Fig. 48).

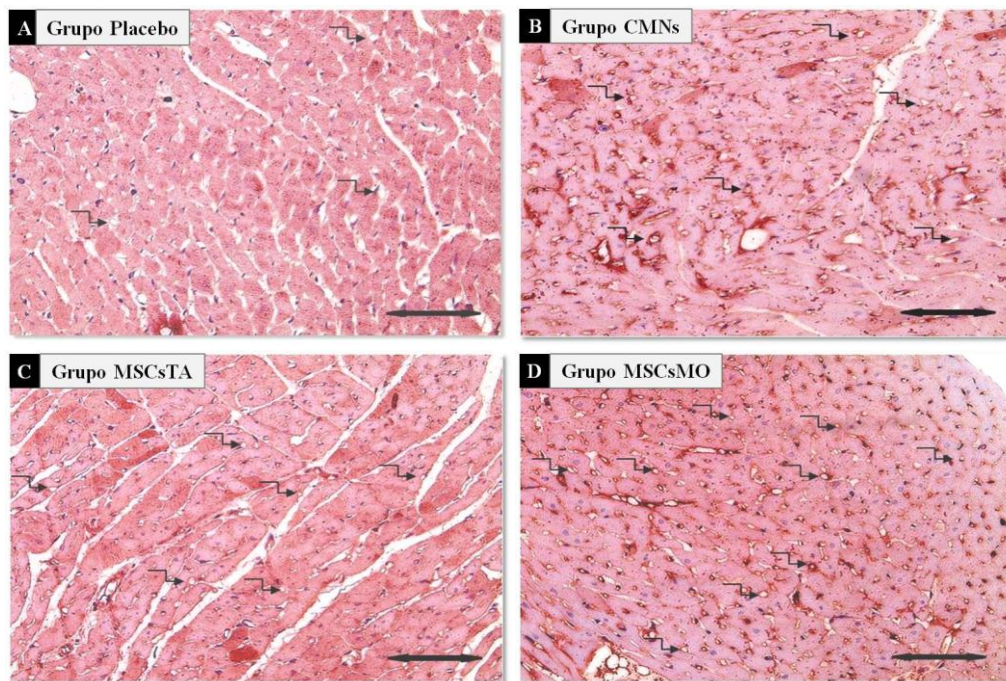


Figura 48.-Análisis inmunohistoquímico de neovascularización con tinción positiva de α -actina derivada de músculo esponjoso (α -SMA). Muestras de tejido cardiaco derivadas de los distintos grupos de tratamiento incluidos en el estudio. **A:** Grupo control. **B:** Grupo CMNs. **C:** Grupo MSCsTA. **D:** Grupo MSCsMO. *Objetivo 20 \times . Escala 100 μ m.*

↗ Pequeños vasos de nueva formación con diámetro $\leq 25\mu$ m.

El número de vasos de pequeño calibre en las muestras de tejido cardiaco pertenecientes al grupo de ratas tratadas con MSCsMO ($98,25 \pm 41,38$ vasos/HPF) fue significativamente mayor al recuento obtenido en las muestras derivadas de los grupos tratados con placebo ($14,64 \pm 10,18$ vasos/HPF; $p=0,008$) y con CMNs ($41,1 \pm 29,95$ vasos/HPF, $p=0,042$).

En comparación con el grupo de ratas tratadas con MSCsTA ($43,83 \pm 36,21$ vasos/HPF), el recuento de vasos de pequeño calibre resultó mayor en el grupo tratado

con MSCsMO pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,077$) (Fig. 49).

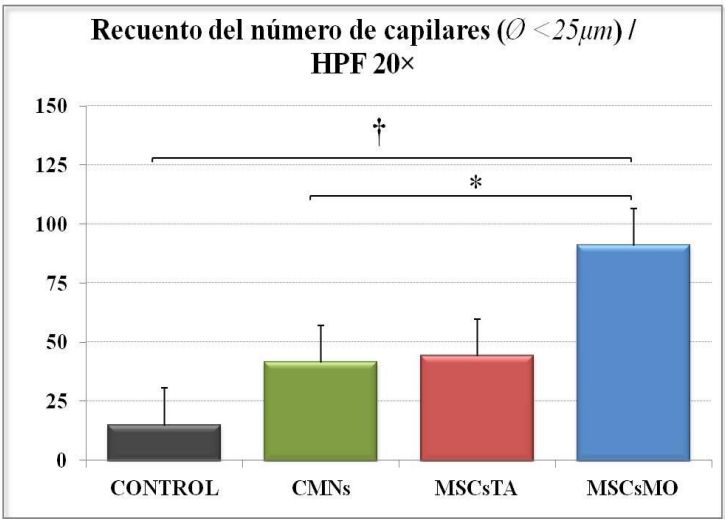


Figura 49.-Análisis cuantitativo del número de vasos de pequeño calibre ($\leq 25\mu m$) en el tejido miocárdico por campo de alta de definición (HPF) en objetivo 20 \times . Los datos se representan como media \pm DE del grupo experimental.

* $p \leq 0.05$ vs grupo CMNs

† $p \leq 0.05$ vs grupo placebo

Del análisis morfo-histológico realizado en las muestras de tejido cardiaco derivadas de los grupos tratados con células, pero no en las del grupo placebo, se identificó un tipo celular contráctil, denominado “Pericito” o “Célula de Rouget”, característico por su marcaje positivo con α -SMA (Fig. 50).

Los pericitos poseen capacidad de diferenciación a células endoteliales maduras y fibras musculares lisas, inducen procesos neoangiogénicos en el tejido en el que se alojan y favorecen los procesos de regeneración tanto funcionales como estructurales.

En el tejido cardiaco analizado se localizaron pericitos alrededor de las células endoteliales que formaban parte de la envoltura de los capilares pequeños neoformados. En el grupo tratado con CMNs se observó la mayor concentración de pericitos en comparación con los grupos tratados con MSCs, entre los que la concentración de pericitos fue muy similar.

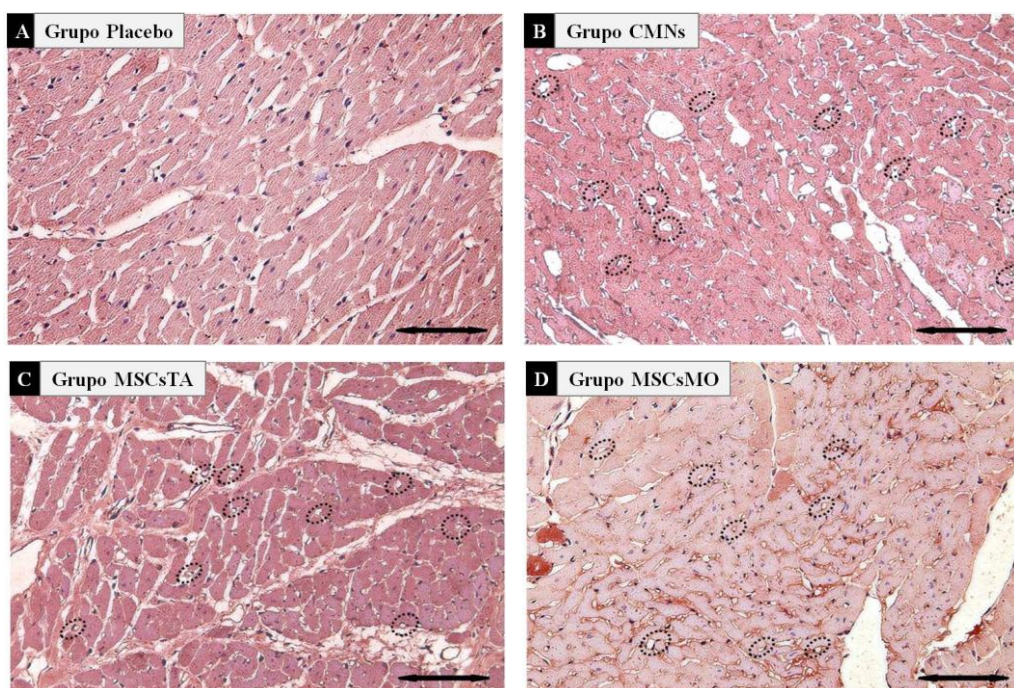


Figura 50.-Pericitos () identificados en el tejido miocárdico de cada uno de los grupos del estudio por microscopía óptica. Tinción α -Smooth Muscle Actine. A: Grupo control. B: Grupo CMNs. C: Grupo MSCsTA. D: Grupo MSCsMO. Objetivo 20 \times . Escala 100 μ m.

2.8.- ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL TEJIDO MIOCÁRDICO

De los 50 corazones extraídos a las ratas que finalizaron el estudio el día +70, se procesaron 12 corazones para el análisis ultraestructural del tejido miocárdico mediante microscopía electrónica de transmisión ($n=3/grupo$).

En el análisis del total de muestras se distinguieron claramente cuatro tipos de fibras cardíacas según el estado de organización de los elementos celulares y del estado de regeneración observado.

Un primer tipo de fibras identificadas fueron las fibras en necrosis. En estas fibras se observó una gran desorganización a nivel ultraestructural, con miofilamentos desintegrados como consecuencia del proceso de necrosis por coagulación de las proteínas contráctiles, desaparición casi total de las miofibrillas, orgánulos intracitoplasmáticos membranosos vacuolizados y mitocondrias tumefactas con crestas desintegradas. A nivel nuclear estas fibras mostraron una cromatina muy densa y contornos irregulares (Fig. 51).

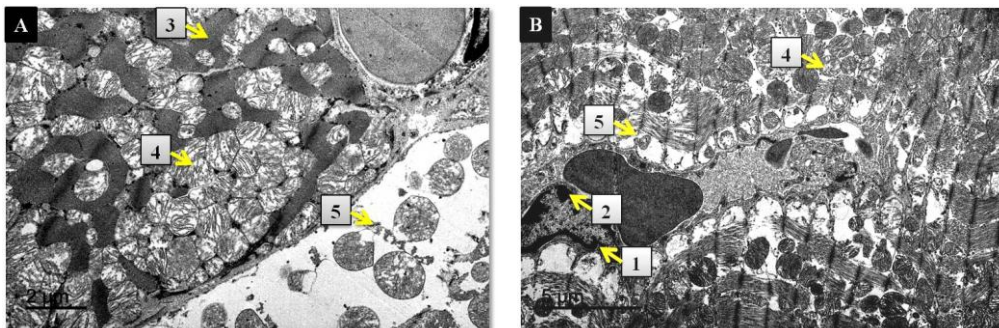


Figura 51.-Fibra cardíaca en necrosis. 1, Contorno nuclear irregular. 2, Cromatina densa. 3, Organoide vacuolizado. 4, Mitocondria tumefacta. 5, Pérdida de miofibrillas. A, Escala 2 μ m. B, Escala 5 μ m.

Las fibras clasificadas como degeneradas presentaban pérdida importante de miofibrillas como consecuencia del proceso de coagulación aunque también se observaron miofibrillas en buen estado de conservación con bandas estriadas evidentes, mitocondrias con pérdida parcial de las crestas y dilatación de las conservadas, retículo sarcoplásmico y aparato de Golgi con cisternas también dilatadas.

A nivel nuclear se observó dilatación de la envoltura nuclear y contorno muy irregular (Fig. 52).

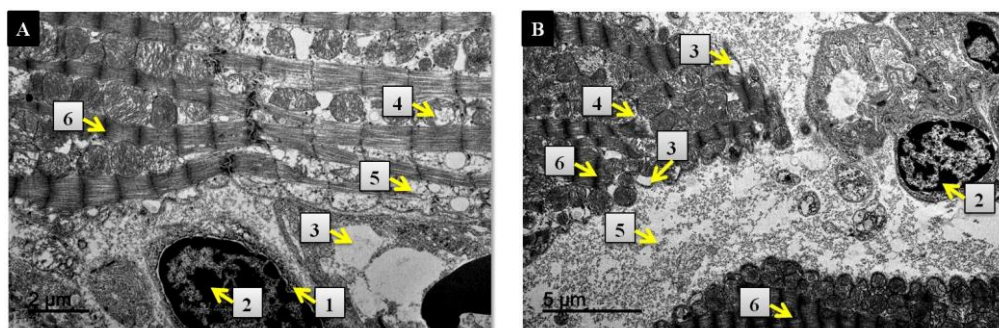


Figura 52.-Fibra cardiaca degenerada. 1, Contorno nuclear irregular y dilatado. 2, Cromatina densa. 3, Organoide dilatado. 4, Mitocondria tumefacta. 5, Pérdida de miofibrillas. 6, Miofibrillas bien conservadas con bandas estriadas. **A**, Escala 2µm. **B**, Escala 5µm.

Se observó un tercer tipo de fibras en recuperación con miofibrillas bien organizadas y estrías evidentes.

En este tipo de fibras se identificaron desmosomas en forma de cúmulos irregulares, propios de fibras poco diferenciadas en fase de organización y recuperación, y desmosomas bien alineados característicos de fibras más recuperadas (Fig. 53).

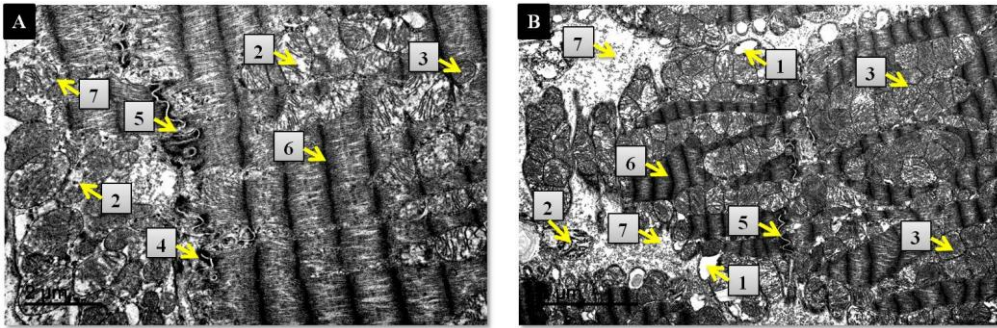


Figura 53.-Fibra cardiaca en recuperación. 1, Organoide dilatado. 2, Mitocondria con pérdida parcial de crestas. 3, Mitocondria íntegra. 4, Cúmulo irregular de desmosomas. 5, Desmosomas bien alineados. 6, Miofibrillas conservadas con bandas estriadas. 7, Pérdida de miofibrillas. **A**, Escala 2 μ m. **B**, Escala 5 μ m.

Finalmente, el cuarto tipo de fibra observado en el análisis ultraestructural del tejido miocárdico fueron fibras recuperadas las cuales presentaban miofibrillas bien organizadas y estrías muy evidentes, abundantes mitocondrias perfectamente conservadas y desmosomas alineados en bandas transversales las cuales se correspondían con los discos intercalares.

La disposición de estos desmosomas fue la característica principal que determinó la recuperación de estas fibras cardiacas (Fig. 54).

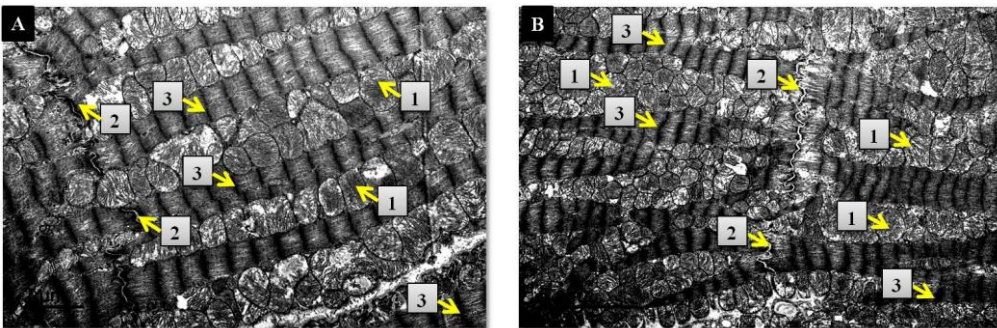


Figura 54.-Fibra cardiaca recuperada. 1, Mitocondria con crestas íntegras. 2, Desmosomas alineados. 3, Miofibrillas con bandas estriadas. 4, Cúmulo irregular de desmosomas. 5, Desmosomas alineados. 6, Miofibrillas conservadas con bandas estriadas. 7, Pérdida de miofibrillas. **A**, Escala 2 μ m. **B**, Escala 5 μ m.

En el análisis de las muestras de tejido cardiaco realizado en cada grupo de ratas se observó que la proporción de los distintos tipos de fibras era diferente. En la tabla 10 se muestran las proporciones en las que cada tipo de fibra se presenta en los distintos grupos de tratamiento incluidos en el estudio.

| Tabla 10.-Porcentaje de cada tipo de fibra, según su organización ultraestructural, por grupo de tratamiento | | | | |
|---|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tipo de fibra definida a nivel de organización ultraestructural | Grupo Placebo (n=3) | Grupo CMNs (n=3) | Grupo MSCsTA (n=3) | Grupo MSCsMO (n=3) |
| Fibras en necrosis | 49,84% | 12,61% | 5,51% | 4,50% |
| Fibras degeneradas | 30,30% | 20,43% | 8,17% | 6,66% |
| Fibras en recuperación | 9,53% | 26,81% | 44,60% | 45,02% |
| Fibras recuperadas | 10,33% | 40,16% | 41,71% | 43,83% |

En las muestras de miocardio derivadas del grupo placebo las fibras en necrosis se presentaron como predominantes seguidas de las degeneradas, en menor proporción. La presencia de fibras en recuperación o recuperadas fue muy reducida.

En las muestras de tejido cardiaco de los grupos de ratas tratadas con MSCs, tanto derivadas de TA como de MO, se observó que las fibras que se presentaban en mayor proporción eran fibras en recuperación y fibras recuperadas, siendo muy reducido el porcentaje de fibras degeneradas y en necrosis.

La proporción obtenida en el grupo tratado con CMNs fue intermedia entre la observada en el grupo placebo y los grupos tratados con MSCs. En este grupo se observó que las fibras con mayor presencia en el miocardio eran fibras recuperadas.

Las fibras en recuperación y las degeneradas se presentaban en proporciones muy similares siendo mucho más reducida la presencia de fibras en necrosis.

Estos resultados derivados del análisis ultraestructural del tejido cardiaco de cada uno de los grupos de ratas del estudio corroboran los descritos anteriormente en el análisis histológico (pto. 2.5).

En ambos análisis se han observado importantes diferencias morfológicas entre el grupo placebo y los grupos tratados con MSCs, tanto derivadas de TA como de MO.

También se han descrito en ambos resultados importantes diferencias entre el grupo placebo y el tratado con CMNs aunque estas diferencias han sido menos evidentes a nivel morfológico.

Además del análisis de las características morfológicas de los pericitos, previamente identificados en la tinción inmunohistoquímica con α -SMA (pto. 2.7), se observó que sólo los pericitos localizados en el tejido cardiaco correspondiente al grupo tratado con MSCsMO presentaban una morfología típica de pericitos funcionales (Fig. 55).

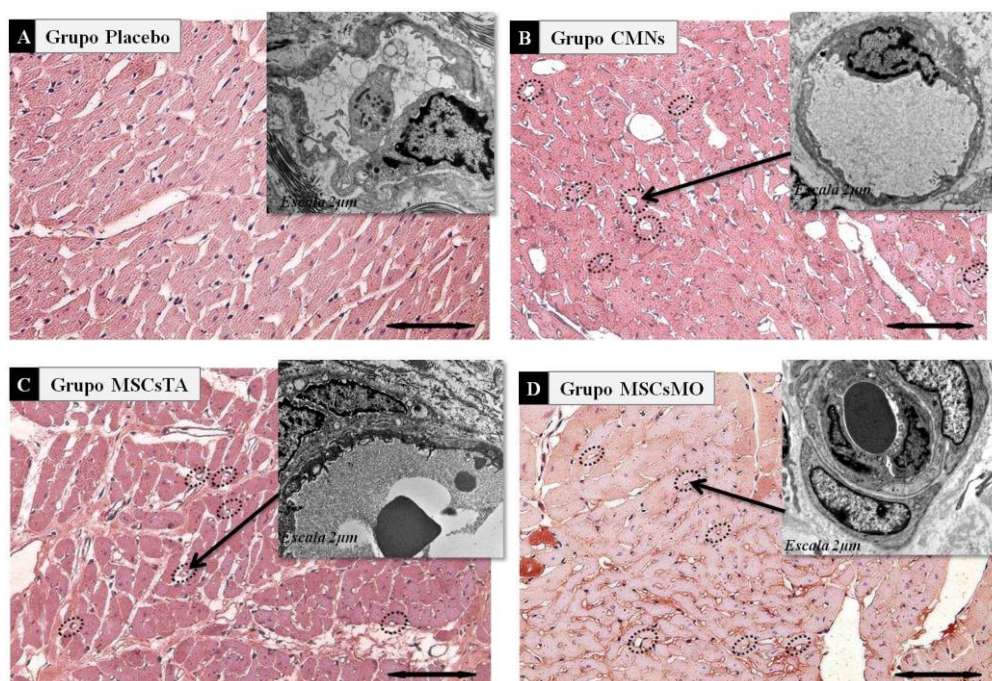


Figura 55. Detalle por microscopía electrónica de pericitos identificados en el tejido cardíaco de los distintos grupos de estudio. **A:** Grupo control. **B:** Grupo CMNs. **C:** Grupo MSCsTA. **D:** Grupo MSCsMO. Escala imagen microscopio electrónico de transmisión 2 μ m. Fondo de imagen: Tejido cardíaco teñido con α -SMA para marcaje de Pericitos (\circ) por microscopía óptica: Objetivo 20 \times , Escala 100 μ m.

Discusión

DISCUSIÓN

Los resultados del trabajo demuestran que la inyección intramiocárdica de MSCs, derivadas de MO y de TA, mejora la función ventricular e induce más procesos angiogénicos en el tejido cardiaco dañado que la inyección de CMNs en un modelo de MCD en rata.

Además, las MSCs derivadas de MO poseen mayor efecto antifibrótico y mejor capacidad de reorganización de las fibras miocárdicas respecto al resto de tipos celulares.

Para el desarrollo de este estudio se ha utilizado un modelo animal de MCD, validado por la literatura, en el cual la inducción inicial de miocarditis autoinmune evoluciona hasta una fase crónica que presenta características similares a la MCD humana como son la insuficiencia cardiaca severa con afectación de la función sistólica y diastólica, y la pérdida de fibras musculares en el miocardio reemplazadas por tejido fibrótico difuso ⁹⁰.

La inyección del producto celular o placebo se ha llevado a cabo el día +42 del estudio, cinco semanas tras la inducción de la MCD, periodo de tiempo en el cual se ha demostrado que se produce una evolución de la histopatología cardiaca hacia una miocarditis cicatrizada, con desaparición de los infiltrados mononucleares, propios del proceso inflamatorio, y un incremento del área fibrótica en el tejido cardiaco lo cual simula la histopatología característica de la MCD en humanos ⁹⁸.

Estudios previos han demostrado que el trasplante de diversos productos celulares produce una mejoría de la función cardiaca en modelos animales de MCD inducida por diversos métodos.

En una revisión sistemática publicada por Gho et al.¹⁰⁵ se han incluido veintinueve artículos relevantes que reportan resultados de terapia celular en diversos modelos animales de MCD. En veinticuatro de estos veintinueve artículos se demuestra recuperación de la función ventricular izquierda, entre un 3% y un 24%, sin eventos adversos importantes.

Sin embargo, la gran heterogeneidad que existe entre estos estudios, respecto al modelo animal seleccionado de MCD (autoinmune, inducida con doxorubicina o con el uso de animales genéticamente seleccionados), al tipo de células administrado (identificados hasta nueve tipos celulares diferentes entre estos estudios), a la dosis celular administrada, a la ruta de administración (vía intracoronaria, intravenosa, intramuscular o mediante injerto laminar) o a la selección del punto final del estudio, hace que resulte complicado obtener una conclusión sólida sobre cuál es el tipo celular más efectivo, si es alguno más favorable respecto a otro, para obtener una mayor recuperación del daño cardiaco causado por la MCD.

En este sentido, nuestro trabajo ofrece por primera vez una comparación directa entre los tipos celulares más utilizados en estudios previos tanto en modelos preclínicos como en ensayos clínicos.

En primer lugar hemos caracterizado fenotípica y funcionalmente los tres tipos celulares objeto del estudio.

Respecto a la población de CMNs, en el análisis fenotípico de las distintas alícuotas hemos observado que los marcadores CD34 y CD117 se presentan en menos

del 10% de la población, el marcador CD45 en más del 50% y el marcador CD133 en menos del 1% de la población de CMNs analizadas. Todos estos porcentajes se encuentran dentro de los límites publicados para MO de rata normal a excepción del porcentaje de CD133 que resulta ligeramente inferior, aunque los límites de normalidad en la literatura son muy variables (entre 15% y 2,1%)^{94,103,106,107}.

A nivel ultraestructural, todas las alícuotas de CMNs utilizadas en nuestro trabajo son morfológicamente similares, con características intracelulares normales y constituidas por dos subpoblaciones principales: monocitos y linfocitos.

Este análisis morfológico nos permite afirmar que ni el proceso de fraccionamiento de la MO ni los procedimientos de congelación y descongelación celular previos alteran la ultraestructura celular a nivel citoplasmático ni nuclear, y además mantienen un elevado nivel metabólico para el desarrollo de funciones paracrinas, propias de esta población celular, ampliamente estudiadas debido al potencial terapéutico de este tipo celular¹⁰⁷.

Respecto al estudio *in vitro* realizado en MSCsMO y MSCsTA, hemos caracterizado las dos poblaciones celulares fenotípica y funcionalmente a lo largo de cinco pases de cultivo en función de cuyos resultados hemos seleccionado finalmente los pases de cultivo de cada población que han sido administrados a los animales en el estudio *in vivo*.

Si bien son abundantes en la literatura los datos comparativos entre MSCs de distinto origen tisular^{34,38}, no existen estudios previos que comparen las características fenotípicas y funcionales de las MSC de rata en distintos pases de cultivo.

La caracterización fenotípica, realizada mediante cuantificación de la expresión de los marcadores de membrana CD90, CD29, CD45 y CD34, ha mostrado que el porcentaje de cada uno de ellos varía a lo largo de los pases de cultivo en las dos poblaciones de MSCs y lo hace de distinta forma en las MSCsMO y las MSCsTA.

La definición de los valores de cada uno de los marcadores en las MSC de rata se encuentran ampliamente consensuados en la literatura, de forma que se define como MSC aquellas poblaciones que presentan un porcentaje mayor o igual al 95% respecto a los marcadores CD90 y CD29, y un porcentaje menor o igual al 5% para los marcadores CD45 y CD34^{73,109,110}. Según estos criterios, las poblaciones de MSCsMO que presentan un fenotipo verdadero de célula mesenquimal son las obtenidas en el pase 2 y en el pase 5 del cultivo. En cambio, para las MSCsTA, las verdaderas poblaciones de MSCs en función de su fenotipo se presentan en los pases de cultivo 2, 3, 4 y 5.

Respecto a la capacidad de diferenciación a las tres principales líneas mesodérmicas, lo que constituye otro de los criterios de definición de las MSCs, en el presente estudio hemos demostrado que la población de MSCsMO presenta máxima capacidad de diferenciación a adipocitos y osteocitos en pase 2 de cultivo, mientras que la población de MSCsTA la presenta en pase 5. La capacidad de diferenciación a línea condrocítica es muy similar en las dos poblaciones siendo máxima en ambos casos en los pases 4 y 5.

Son escasos los estudios publicados en los que se compara la capacidad de diferenciación de distintas poblaciones de MSC^{109,110}. Uno de estos estudios publicados¹⁰⁹ compara el potencial de diferenciación de MSCsMO, MSCsTA y MSCs derivadas de cartílago, expandidas en pase 3 de cultivo, y demuestra que las MSCsTA poseen mayor capacidad de diferenciación adipocítica, las MSCsMO mayor potencial osteogénico, mientras que potencial de diferenciación condrocítico es similar. Estos mismos resultados, respecto a la diferenciación condrocítica, han sido reproducidos por otros autores¹¹¹.

Como parte de la caracterización funcional de las MSCsMO y las MSCsTA hemos determinado la capacidad de secreción de factores solubles a lo largo de los diferentes pases de cultivo. Hemos demostrado que las MSCs expandidas *in vitro*, independientemente del origen medular o adiposo, poseen una capacidad de secreción

de factores relacionados con procesos vasculogénicos y angiogénicos, como el VEGF, antifibróticos, como el TGF- β 1 y de proliferación celular, como el FGF_b, muy similar a lo largo de los cinco pases de cultivo estudiados. Además, entre ambas poblaciones celulares no existen diferencias significativas respecto a su capacidad de secreción de dichos factores.

Un resultado interesante que podemos destacar es la tendencia de las MSCsTA, mantenida a lo largo de los diferentes pases, de secretar más VEGF en comparación con las MSCsMO aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Resultados similares han sido publicados en estudios previos ¹¹¹.

En base a estos resultados del estudio *in vitro* de cada población de MSCs, hemos seleccionado para su administración como tratamiento en el modelo animal de MCD desarrollado en el estudio *in vivo*, el pase de cultivo en el cual las células han cumplido todos los criterios fenotípicos y funcionales propios de células mesenquimales: pase 2 para las MSCsMO y pase 5 para las MSCsTA.

Morfológicamente hemos confirmado que a nivel intracelular no existe ninguna diferencia entre la población de MSCsMOp2 y la población MSCsTAp5 que pueda influir en su capacidad para la recuperación del daño cardíaco.

Las diferencias observadas a nivel ultraestructural consisten en que las MSCsMOp2 son morfológicamente más esféricas, presentan orgánulos distribuidos de forma irregular en su endoplasma y carecen de exosomas con gránulos de glucógeno- β en su interior ¹¹², y las MSCsTAp5 presentan mayor número de prolongaciones en su membrana plasmática, orgánulos distribuidos de forma regular en el citoplasma y presentan endosomas y exosomas con un alto contenido de gránulos de glucógeno- β en su interior ¹¹³.

Esta selección realizada en ambas poblaciones celulares constituye el primer objetivo específico del presente trabajo y aporta una valiosa información acerca de uno

de los puntos críticos en la literatura respecto a la selección de la población celular a utilizar en terapia celular para que los resultados sean comparables.

El segundo objetivo específico del presente estudio ha sido alcanzado con el desarrollo del estudio *in vivo* en el cual hemos comparado los efectos de la inyección intramiocárdica de los tres tipos celulares seleccionados (CMNs, MSCsTAp5 y MSCsMOp2) sobre la recuperación funcional y morfoestructural del tejido cardíaco dañado por la MCD inducida en el modelo murino desarrollado.

Para determinar el grado de recuperación funcional del miocardio, cuantificado mediante ecocardiografía, hemos utilizado dos métodos de medida: el primero ha sido la comparación de los resultados de la función ventricular el día +42, previo a la administración del producto celular, respecto a los resultados obtenidos el día +70, y el segundo la comparación en día +70 de los parámetros ecocardiográficos obtenidos en el grupo control respecto al resto de grupos tratados con células.

Nuestros resultados han demostrado que tras la inyección de MSCsMO se produce una mejoría final neta de la FE, FA, DFS y del VFS en el día +70 respecto a los valores previos a la infusión celular, el día +42, no observándose esta mejoría en los animales tratados con placebo, CMNs o MSCsTA. En consecuencia, el día +70 la función ventricular resultó significativamente mejor en los animales tratados con MSCsMO que en los que recibieron placebo o CMNs.

Estos resultados son comparables con los obtenidos en estudios publicados previamente en los que se ha testado cada tipo celular de forma aislada. Así, en el estudio de Nagaya et al.⁷³ la administración de una dosis de MSCsMO de 5×10^6 células en un modelo de MCD tras miocarditis autoinmune produjo una disminución significativa de la presión telediastólica y un incremento de la dP/dt máxima del VI respecto al grupo control.

Por el contrario, en otro estudio publicado ¹¹⁴ la infusión de $1,2 \times 10^6$ CMNs en un modelo de MCD inducida por doxorrubicina no produjo diferencias significativas respecto a la infusión de placebo en cuanto al diámetro telesistólico, la FA y presión telediastólica, si bien se redujeron en el grupo trasplantado ciertos signos de insuficiencia cardíaca (peso del corazón, ascitis y concentración sérica de BNP) ¹¹⁵.

Respecto al tercer tipo celular incluido en nuestro estudio, los resultados derivados de la determinación de la función ventricular en los animales que recibieron MSCsTA han demostrado unos valores de FE y FA el día +70 significativamente superiores a los observados en el grupo control aunque los valores de estos parámetros ecocardiográficos en día +70 no se incrementan de forma significativa respecto a sus propios valores del día +42.

La información que existe en la literatura sobre las MSCsTA relacionada con su capacidad de recuperación del daño causado por la MCD, tras ser administradas por vía intramiocárdica, es muy reducida.

Uno de los estudios publicados es el realizado por Lin et al. ⁹⁶ quienes observaron una recuperación del 4,1% de la FE del VI respecto al grupo control y, al igual que en nuestro estudio, no observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores previos a la administración del tratamiento.

Así, resumiendo todos los resultados derivados del estudio ecocardiográfico de la función ventricular obtenidos a partir de las distintas comparaciones realizadas, podemos concluir que las MSCsMO son capaces de mejorar significativamente todos los parámetros de función ventricular excepto los relacionados con las dimensiones diastólicas.

Además, las MSCsTA favorecen un incremento de la FE y la FA de forma que resultan superiores a los valores observados en los animales que recibieron CMNs o placebo, si bien esta mejoría final observada no es significativa respecto a sus propios valores en el día de máximo daño, día+42.

En este sentido, nuestros resultados confirman los publicados previamente para cada tipo celular de forma individual proporcionando ppor primera vez una comparación directa entre los tres tipos celulares estudiados en un mismo modelo de MCD.

Respecto al examen histológico, las diferencias entre los grupos concuerdan con los resultados obtenidos en la recuperación de la función cardiaca final.

Las muestras de tejido cardiaco procedentes de ratas tratadas con MSCsMO muestran principalmente fibras cardiacas morfológicamente normales con núcleos centrales, miofibrillas bien desarrolladas y estriaciones trasversales de las propias fibras bien organizadas, en contraste con las características que presentan las muestras de tejido procedentes del grupo tratado con placebo en las que la mayoría de las fibras se encuentran en un estadio necrótico.

Las muestras derivadas del grupo MSCsTA o CMNs muestran niveles intermedios de daño entre los observados en el grupo control y los observados en el grupo MSCsMO.

El análisis de la ultraestructura de las fibras cardiacas, a pesar del reducido número de muestras analizado (tres por grupo), parece confirmar las observaciones histológicas. Hemos identificado importantes diferencias en el nivel de daño presente en las muestras derivadas del grupo control, máximo daño, comparado con el mínimo daño observado en el grupo MSCsMO. En los grupos tratados con MSCsTA y con CMNs el nivel de daño observado ha sido intermedio.

Respecto al análisis cuantitativo de las fibras de colágeno, hemos demostrado que el tejido cardiaco procedente de los animales tratados con MSCsTA presenta un porcentaje de fibras de colágeno muy elevado y similar al del grupo control, al contrario que los animales tratados con CMNs los cuales muestran un porcentaje significativamente inferior a dicho grupo control.

Esta reducción es aún mayor en las muestras derivadas de animales tratados con MSCsMO en comparación con el grupo control.

Estos resultados confirman los publicados en estudios previos en los que se demuestra que tanto el trasplante de CMNs ¹¹⁶ como el de MSCsMO ⁷³ puede reducir el volumen de la fracción de colágeno por medio de la disminución de la sobreexpresión de metaloproteinasas por parte de la matriz, sobreexpresión generada por el estrés inducido en el tejido por el propio proceso fibrótico, y además aportan evidencias directas sobre la mayor capacidad de las MSCsMO para reducir la acumulación de fibras de colágeno en el remodelado ventricular en comparación a las CMNs.

En el análisis de la microvasculatura del miocardio hemos demostrado que el número de pequeños vasos en los corazones de animales tratados con MSCs es significativamente mayor respecto a los tratados con CMNs o placebo.

Muchos estudios han demostrado que la microvasculatura intramiocárdica, identificada como vasos de calibre $\leq 200 \mu\text{m}$ de diámetro, podría ser la responsable directa del suministro de sangre al tejido dañado y se encuentra reducida en pacientes que padecen MCD en comparación con individuos sanos ¹¹⁷.

A pesar de este hecho, en estos pacientes se produce un incremento significativo del número de células CD34+ circulantes y de progenitores endoteliales asociado con niveles elevados en suero de VEGF cuando se encuentran en un estadio temprano de la MCD, reduciéndose estos niveles cuando la insuficiencia cardíaca empeora ¹¹⁸.

También se ha establecido una asociación directa entre la perfusión del miocardio y el mal pronóstico de la MCD ¹¹⁹.

Por tanto, y en base a estos resultados, podemos argumentar que la mejoría inducida por las MSCs sobre la microvasculatura del tejido miocárdico podría haber

contribuido, al menos en parte, a la mayor recuperación de la función ventricular en estos grupos de animales.

En este sentido, es interesante considerar las diferencias encontradas en nuestro estudio en la concentración sérica de VEGF entre los grupos de animales. Así, aunque las CMNs causan un pico significativamente superior a todos los demás grupos durante las primeras 24 horas, la inyección de MSC, pero no de CMN, producen niveles persistentemente elevados de VEGF hasta el día +70. Este mantenimiento de los niveles de VEGF en el suero condiciona, muy probablemente, el incremento de la microvasculatura que hemos observado en los dos grupos de animales tratados con MSCs.

Estos resultados complementan estudios publicados que demuestran un segundo posible efecto de las MSCs sobre la microvasculatura consistente en la expresión de α -actina y factor de von Willebrand por las MSCs, tras la inyección intramiocárdica en ratas con MCD y su participación directa en la formación de la pared vascular ⁷³.

Son varios los mecanismos de acción que han sido propuestos para explicar la mejoría observada en la función cardíaca tras la administración de diversos productos de terapia celular en procesos tanto isquémicos como no isquémicos.

Uno de estos mecanismos podría ser el demostrado por Nagaya et al. ⁷³ quienes observaron que las MSCsMO poseían la capacidad de integrarse en el tejido miocárdico y de expresar marcadores cardíacos como Desmina, Troponina-T y Conexina-43.

En nuestro trabajo no hemos investigado la capacidad de integración de las células administradas en el tejido miocárdico; sin embargo, entre los trabajos publicados parece existir un acuerdo general sobre esta capacidad de las MSCsMO aunque éste, sin duda, no es su principal mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de las MSCs consiste, más probablemente, en una combinación de procesos mediados por citoquinas entre los que se incluyen la angiogénesis y la miogénesis, así como efectos antiapoptóticos y antifibróticos.

En la literatura existen estudios diseñados con el objetivo de clarificar algunos de estos mecanismos, en los que se ha comparado el perfil transcriptómico de las MSC con el de los progenitores derivados de MO ¹²⁰ demostrándose que las MSCs sobre-regulan la expresión de genes relacionados con la proliferación de músculo liso y músculo miocárdico, con la morfogénesis ventricular y con las respuestas angiogénica y antiinflamatoria más que los progenitores de MO.

Respecto a posibles diferencias entre las MSCsMO y MSCsTA, estudios realizados han demostrado que ambos tipos celulares poseen una capacidad de expresión similar de citoquinas relacionadas con la proliferación celular, la quimiotaxis y la respuesta inmune, sin embargo las MSCsMO presentan mayores niveles de expresión de citoquinas relacionadas con la angiogénesis y las MSCsTA de aquellas relacionadas con la respuesta inflamatoria. Además, sólo las MSCsTA son capaces de inducir una regulación negativa de la proliferación de músculo de liso.

Según estos resultados, los dos tipos de MSCs muestran un potencial terapéutico diferente. Sin embargo, en el contexto general de la reparación cardiovascular, el conjunto de mecanismos terapéuticos potenciales ofrecidos por los componentes secretados por las MSCs incluyen la preservación del tejido mediante los efectos antiapoptóticos y promitóticos, la neovascularización, la respuesta antiinflamatoria mediante procesos antifibróticos y supresión de células inflamatorias, y la activación de progenitores endógenos y células troncales residentes ¹²¹.

Por otro lado, es importante tener en cuenta que el modelo de daño miocárdico utilizado en el presente estudio, y en los desarrollados por otros investigadores ⁷³ para simular la MCD humana, es de origen autoinmune ¹²⁰, y que es bien conocido el

potente efecto inmunosupresor de las MSCs, tanto derivadas de MO como de TA, efecto del que las CMNs carecen.

Por tanto, aunque el día +42 del estudio la fibrosis está plenamente establecida como sustitución del infiltrado inflamatorio, no es posible descartar totalmente el papel jugado por las MSCs a través de su capacidad inmunosupresora, al menos en parte, lo cual otorga, hipotéticamente, una ventaja a este tipo celular sobre las CMNs en la mejoría del daño miocárdico ¹²¹⁻¹²³.

Sería necesaria la realización de más estudios para que pudiera ser aclarado este punto.

Finalmente, son numerosos los ensayos clínicos realizados, tanto por nuestro grupo ¹²⁴ como otros ^{125,126}, en los que se ha demostrado que la infusión de CMNs por vía intracoronaria produce una mejoría de la función ventricular izquierda en pacientes con MCD idiopática.

A pesar de no existir una explicación clara que justifique los resultados contradictorios obtenidos en el modelo animal respecto a los derivados de ensayos clínicos, podemos hipotetizar que dichas diferencias podrían ser debidas a las distintas rutas de administración seleccionadas (intracoronaria en los estudios clínicos *versus* intramiocárdica en nuestro estudio) y la complejidad en la patogénesis de la MCD en humanos, que hace difícil su reproducción exacta mediante ningún modelo animal.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1.-Las MSCs derivadas de MO y de TA de rata Wistar de 9 ± 2 semanas de edad son similares en cuanto a fenotipo celular, potencial de diferenciación y capacidad de secreción de VEGF, TGF- β 1 y FGFb en los pases dos y cinco de cultivo respectivamente, lo que posibilita que la funcionalidad esperada en la recuperación del daño miocárdico en un modelo animal de MCD sea comparable.

2.-La inyección intramiocárdica de MSCsMO en un modelo murino de MCD autoinmune inducida, mejora de un modo significativo la función cardiaca final (FE, FA, DFS, VFS), excepto en los parámetros relacionados con la función diastólica (DFD, VFD), en comparación con la función observada en el punto de máximo daño del estudio, previo a la administración del tratamiento, el día +42 del estudio.

3.-La inyección intramiocárdica de MSCsTA incrementa la FE final y la FA final significativamente más que la inyección de placebo, si bien, dichos valores finales no son significativamente superiores a los obtenidos en el punto de máximo daño del estudio, previos a inyección.

4.-A nivel ultraestructural, la reorganización y regeneración de las fibras cardiacas dañadas por la MCD en el modelo estudiado es superior tras la inyección intramiocárdica de MSCsMO respecto a la observada tras la inyección del resto de tratamientos, siendo dicha reorganización similar tras la inyección de CMNs y MSCsTA, y a su vez superior a la observada tras la inyección del placebo.

5.-Las MSCsMO inyectadas en día +42 en el miocardio en el modelo estudiado de MCD presentan una capacidad de inhibición y/o reparación del proceso fibrótico

significativamente superior a las CMNs y MSCsTA administradas el mismo día y por el mismo procedimiento.

6.-La capacidad de generación de nuevos vasos de pequeño calibre en el miocardio dañado por la MCD por las MSCsMO inyectadas el día +42 del estudio es significativamente superior a la observada tras la inyección de las CMNs y las MSCsTA.

7.-La inyección intramiocárdica de CMNs produce un aumento de la concentración sérica de VEGF a las 24 horas de dicha inyección, significativamente superior al observado tras la inyección de los otros dos tipos celulares estudiados, pero el día +70 sólo los animales tratados con MSCs, tanto de MO como de TA, mantienen unos niveles de VEGF en suero elevados siendo además significativamente mayores los observados en los animales tratados con MSCsTA.

8.-Considerados de forma global, nuestros resultados permiten concluir que las MSCsMO muestran en nuestro modelo de MCD una eficacia superior a los otros dos tipos celulares en la recuperación tanto funcional como morfológica del miocardio.

Bibliografía

1. Mironov V, Visconti RP, Markwald RR. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4(6):773-81. PMID:15174961. Review.
2. Aristotle. The complete works of Aristotle, The revised Oxford translation. Oxford edition. Princeton, NJ: Princeton University Press. 1984
3. Matthews LG. SS. Cosmas and Damian-Patron Saints of Medicine and Pharmacy Their Cult in England. *Medical History.* 1968;12(3):281-88. PMCID: PMC1033831
4. Dinsmore E. A history of regeneration research: milestones in the evolution of a science. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
5. Coleman W. Biology in the nineteenth century: problems of form, function and transformation. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1978.
6. Stocum D. An overview of regenerative biology and medicine. *Regenerative biology and medicine.* 1st ed. Oxford: Academic Press; 2006. pp. 1–20
7. Wohlrab F, Henoch U. The life and work of Carl Weigert (1845–1904) in Leipzig 1878–1885. *Zentralbl Allg Pathol.* 1988;134(8):743–51. PMID: 3068935
8. American Cancer Society. Unproven methods of cancer management: Fresh cell therapy. *CA Cancer J Clin.* 1991;41(2):126-28. DOI:10.3322/canjclin.41.2.126
9. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol.* 1999;36(4 Suppl 7):95-103. PMID:10595758. Review.
10. Leff D. New biological assembly line. The cell: Inter-and intra-relationships. New Jersey: Avery Publishing Group; 1983. p.20-27.
11. Hayflick L. Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both. *PLoS Genet.* 2007;3(12):e220. DOI:10.1371/journal.pgen.0030220

12. Kleinsmith LJ, Pierce GB Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* 1964; 24: 1544–51. PMID:14234000
13. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-47. DOI:10.1126/science.282.5391.1145. Erratum in LETTERS CORRECTIONS AND CLARIFICATIONS. *Science.* 1998;282(5395):1827. DOI:10.1126/science.282.5395.1823f.
14. Singla DK. Embryonic stem cells in cardiac repair and regeneration. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(8):1857-63. DOI:10.1089=ars.2009.2491. Review.
15. Jacobson LO, Marks EK, Robson MJ, Gaston EO, Zirkle RE. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med.* 1949;34:1538–43.
16. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12(1):197–201. PMID:14874130.
17. Chao MP, Seita J, Weissman IL. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008;73:439–49. DOI: 10.1101/sqb.2008.73.031.
18. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009, 217(2):144-60.DOI: 10.1002/path.2498.
19. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects. *J Transl Med.* 2010;8:131. DOI: 10.1186/1479-5876-8-131.
20. Prosper F, Verfaillie CM. Adult stem cells. *An Sist Sanit Navar.* 2003;26(3):345-56. PMID:14716365.

21. Cuende N, Rico L, Herrera C. Concise review: bone marrow mononuclear cells for the treatment of ischemic syndromes: medicinal product or cell transplantation? *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(5):403-08. DOI:10.5966/sctm.2011-0064.
22. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1395-402. DOI:10.1172/JCI12150.
23. Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells.* 2006;24(1):3-12. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0116. Review.
24. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol.* 2002;30(8):896-904. [https://DOI.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00869-X](https://DOI.org/10.1016/S0301-472X(02)00869-X). Erratum: *Exp Hematol.* 2006;34(6):809 and *Exp Hematol.* 2006;34(4):554.
25. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. Bone Marrow - Home of Versatile Stem Cells. *Transfus Med Hemother.* 2008;35(3):248-59. DOI:10.1159/000125585.
26. Ji KH, Xiong J, Hu KM, Fan LX, Liu HQ. Simultaneous expression of Oct4 and genes of three germ layers in single cell-derived multipotent adult progenitor cells. *Ann Hematol.* 2008;87(6):431-8. DOI:10.1007/s00277-008-0470-3.
27. Park C, Ma YD, Choi K. Evidence for the hemangioblast. *Exp Hematol.* 2005;33(9):965-70. DOI:10.1016/j.exphem.2005.06.003.
28. Ratajczak MZ, Borkowska S, Mierzejewska K, Kucia M, Mendek-Czajkowska E, Suszynska M, et al. Further evidence that paroxysmal nocturnal haemoglobinuria is a disorder of defective cell membrane lipid rafts. *J Cell Mol Med.* 2015;19(9):2193-201. DOI:10.1111/jcmm.12605.

29. Ratajczak MZ, Ratajczak J, Suszynska M, Miller DM, Kucia M, Shin DM. A Novel View of the Adult Stem Cell Compartment From the Perspective of a Quiescent Population of Very Small Embryonic-Like Stem Cells. *Circ Res.* 2017;120(1):166-78. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.309362. Review.
30. Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells.* 2008;26(8):2083-92. DOI:10.1634/stemcells.2007-0922.
31. Miyamoto Y, Suyama T, Yashita T, Akimaru H, Kurata H. Bone marrow subpopulations contain distinct types of endothelial progenitor cells and angiogenic cytokine-producing cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(5):627-35. DOI:10.1016/j.yjmcc.2007.08.001.
32. Sukmawati D, Tanaka R. Introduction to next generation of endothelial progenitor cell therapy: a promise in vascular medicine. *Am J Transl Res.* 2015;7(3):411-21. eCollection 2015. PMID:PMC4448183. Review.
33. Kucia M, Reca R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2005;19(7):1118-27. DOI:10.1038/sj.leu.2403796. Review.
34. Malhotra S, Hu MS, Marshall CD, Leavitt T, Cheung AT, Gonzalez JG, et al. Mesenchymal Stromal Cells as Cell-Based Therapeutics for Wound Healing. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4157934. DOI:10.1155/2016/4157934.
35. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116(8):1413-30. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614. Review.
36. Pelekanos RA, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, et al. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite

- maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res.* 2012;8(1):58-73. DOI:10.1016/j.scr.2011.08.003. Erratum: *Stem Cell Res.* 2012;9(1):58.
37. Chong JJ, Chandrakanthan V, Xaymardan M, Asli NS, Li J, Ahmed I, et al. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. *Cell Stem Cell.* 2011;9(6):527-40. DOI:10.1016/j.stem.2011.10.002.
38. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 2010;28(3):585-96. DOI: 10.1002/stem.269.
39. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28. DOI:10.1089/107632701300062859.
40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. DOI:10.1080/14653240600855905.
41. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(6):443-454. DOI:10.1007/s00005-016-0394-x. Review.
42. Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD, et al. Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation.* 2010;122(23):2419-29. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.955971.
43. English K, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation. *J Cell Biochem.* 2011;112(8):1963-8. DOI:10.1002/jcb.23119. Review.
44. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res.* 1998;83(1):1-14. Review. PMID:9670913.

45. Faiella W, Atoui R. Therapeutic use of stem cells for cardiovascular disease. *Clin Transl Med.* 2016;5(1):34. DOI:10.1186/s40169-016-0116-3. Review.
46. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1373-416. DOI:10.1152/physrev.00013.2005. Review.
47. Lee BC, Hsu HC, Tseng WY, Chen CY, Lin HJ, Ho YL, et al. Cell therapy generates a favourable chemokine gradient for stem cell recruitment into the infarcted heart in rabbits. *Eur J Heart Fail.* 2009;11(3):238-45. DOI:10.1093/eurjhf/hfn035.
48. Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(4):530-44. DOI:10.1016/j.yjmcc.2008.08.003.
49. Ii M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, et al. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res.* 2006;98(5):697-704. DOI:10.1161/01.RES.0000209948.50943.ea.
50. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106(15):1913-8. PMID:12370212.
51. Bilgimol JC, Ragupathi S, Vengadassalapathy L, Senthil NS, Selvakumar K, et al. Stem cells: An eventual treatment option for heart diseases. *World J Stem Cells.* 2015;7(8):1118-26. DOI:10.4252/wjsc.v7.i8.1118.
52. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20(13):1692-708. DOI:10.1101/gad.1419406. Review.
53. Durrani S, Konoplyannikov M, Ashraf M, Haider KH. Skeletal myoblasts for cardiac repair. *Regen Med.* 2010;5(6):919-32. DOI: 10.2217/rme.10.65.

-
54. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008;132(4):661-80. DOI:10.1016/j.cell.2008.02.008.
 55. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007;21(7):1345-57. DOI:10.1096/fj.06-6769com.
 56. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, et al. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S29-37. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084343.
 57. Ye L, Chang YH, Xiong Q, Zhang P, Zhang L, Somasundaram P, et al. Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells. *Cell Stem Cell*. 2014;15(6):750-61. DOI:10.1016/j.stem.2014.11.009. Erratum: *Cell Stem Cell*. 2015;16(1):102.
 58. Bareja A, Gomez JA, Dzau VJ. Emerging Concepts in Paracrine Mechanisms in Regenerative Cardiovascular Medicine and Biology. *Circ Res*. 2016;118(1):95-107. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305373.
 59. Mirotso M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gneccchi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50(2):280-9. DOI:10.1016/j.yjmcc.2010.08.005.
 60. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2017;390(10092):400-14. DOI:10.1016/S0140-6736(16)31713-5.
 61. Fuster V, Alexandre R, O'Rourke R, Roberts R, King III S, Wellens H. 10ª Edición. Madrid. McGraw-Hill-Interamericana;2002.

62. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(1):12-8. PMID:7598572.
63. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(3):654-60;discussion 660-1. PMID:8783989.
64. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(3):513-22. DOI:10.1006/jmcc.1998.0882.
65. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med.* 1998;4(8):929-33. PMID:9701245. Erratum: *Nat Med.* 1998;4(10):1200.
66. Watanabe E, Smith DM Jr, Delcarpio JB, Sun J, Smart FW, Van Meter CH Jr, et al. Cardiomyocyte transplantation in a porcine myocardial infarction model. *Cell Transplant.* 1998;7(3):239-46. PMID:9647433.
67. Scorsin M, Hagege AA, Dolizy I, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, et al. Can cellular transplantation improve function in doxorubicin-induced heart failure? *Circulation.* 1998;98(19 Suppl):II151-5;discussion II155-6. PMID:9852897.
68. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Jia ZQ, Kim EJ, Tomita S, Yau TM. Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III204-9. PMID:11082388.
69. Pouly J, Hagege AA, Vilquin JT, Bissery A, Rouche A, Bruneval P, et al. Does the functional efficacy of skeletal myoblast transplantation extend to nonischemic cardiomyopathy? *Circulation.* 2004;110(12):1626-31. DOI:10.1161/01.CIR.0000142861.55862.15.

70. Suzuki K, Murtuza B, Suzuki N, Smolenski RT, Yacoub MH. Intracoronary infusion of skeletal myoblasts improves cardiac function in doxorubicin-induced heart failure. *Circulation*. 2001;104(12 Suppl 1):I213-7. PMID:11568058.
71. Werner L, Deutsch V, Barshack I, Miller H, Keren G, George J. Transfer of endothelial progenitor cells improves myocardial performance in rats with dilated cardiomyopathy induced following experimental myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39(4):691-7. DOI:10.1016/j.yjmcc.2005.06.015.
72. Hata H, Matsumiya G, Miyagawa S, Kondoh H, Kawaguchi N, Matsuura N, et al. Grafted skeletal myoblast sheets attenuate myocardial remodeling in pacing-induced canine heart failure model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(4):918-24. DOI:10.1016/j.jtcvs.2006.01.024.
73. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(8):1128-35. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500447.
74. Kondoh H, Sawa Y, Fukushima N, Matsumiya G, Miyagawa S, Kitagawa-Sakakida S, et al. Combined strategy using myoblasts and hepatocyte growth factor in dilated cardiomyopathic hamsters. *Ann Thorac Surg*. 2007;84(1):134-41. DOI:10.1016/j.athoracsur.2007.03.052.
75. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Hiraoka K, Yamasaki K, Hashiya N, et al. Angiogenesis and antifibrotic action by hepatocyte growth factor in cardiomyopathy. *Hypertension*. 2002;40(1):47-53. PMID:12105137.
76. Tezuka A, Kawada T, Nakazawa M, Masui F, Konno S, Nitta S, et al. Which skeletal myoblasts and how to be transplanted for cardiac repair? *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(1):270-6. DOI:10.1016/j.bbrc.2007.11.084.
77. Yamada S, Nelson TJ, Crespo-Diaz RJ, Perez-Terzic C, Liu XK, Miki T, Seino S, Behfar A, Terzic A. Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic

- cardiomyopathy. *Stem Cells*. 2008;26(10):2644-53. DOI:10.1634/stemcells.2008-0187.
78. Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K, Marui A, Yoshimoto M, Premaratne GU, et al. Delivery route in bone marrow cell transplantation should be optimized according to the etiology of heart disease. *Circ J*. 2008;72(9):1528-35. PMID:18724034.
 79. Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Chiang CH, Lee FY, Wu CJ, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy alleviates left ventricular remodeling and improves heart function in rat-dilated cardiomyopathy. *Crit Care Med*. 2009;37(4):1197-205. DOI:10.1097/CCM.0b013e31819c0667.
 80. Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(6):H1888-97. DOI:10.1152/ajpheart.00186.2009.
 81. Garbade J, Dhein S, Lipinski C, Aupperle H, Arsalan M, Borger MA, et al. Bone marrow-derived stem cells attenuate impaired contractility and enhance capillary density in a rabbit model of Doxorubicin-induced failing hearts. *J Card Surg*. 2009;24(5):591-9. DOI:10.1111/j.1540-8191.2009.00844.x.
 82. Jin B, Luo XP, Ni HC, Li Y, Shi HM. Cardiac matrix remodeling following intracoronary cell transplantation in dilated cardiomyopathic rabbits. *Mol Biol Rep*. 2010;37(6):3037-42. DOI:10.1007/s11033-009-9874-y.
 83. Chen Y, Liu W, Li W, Gao C. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(2):311-5. DOI:10.1016/j.yexmp.2009.12.002.
 84. Psaltis PJ, Carbone A, Nelson AJ, Lau DH, Jantzen T, Manavis J, et al. Reparative effects of allogeneic mesenchymal precursor cells delivered transendocardially in

- experimental nonischemic cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc Interv.* 2010;3(9):974-83. DOI:10.1016/j.jcin.2010.05.016.
85. Yu Q, Li Q, Na R, Li X, Liu B, Meng L, et al. Impact of repeated intravenous bone marrow mesenchymal stem cells infusion on myocardial collagen network remodeling in a rat model of doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2014;387(1-2):279-85. DOI:10.1007/s11010-013-1894-1.
86. Lin YC, Leu S, Sun CK, Yen CH, Kao YH, Chang LT, et al. Early combined treatment with sildenafil and adipose-derived mesenchymal stem cells preserves heart function in rat dilated cardiomyopathy. *J Transl Med.* 2010;8:88. DOI:10.1186/1479-5876-8-88.
87. Li L, Xia Y. Study of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplantation for rats with dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2014;20(5):398-406. PMID:24492176.
88. Yu Q, Fang W, Zhu N, Zheng X, Na R, Liu B, et al. Beneficial effects of intramyocardial mesenchymal stem cells and VEGF165 plasmid injection in rats with furazolidone induced dilated cardiomyopathy. *J Cell Mol Med.* 2015;19(8):1868-76. DOI:10.1111/jcmm.12558.
89. Shirasaka T, Miyagawa S, Fukushima S, Kawaguchi N, Nakatani S, Daimon T, et al. Skeletal Myoblast Cell Sheet Implantation Ameliorates Both Systolic and Diastolic Cardiac Performance in Canine Dilated Cardiomyopathy Model. *Transplantation.* 2016;100(2):295-302. DOI:10.1097/TP.0000000000001014.
90. Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K, et al. Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res.* 1994;75:278-84. PMID:8033341.
91. Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, et al. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced

- p>brain damage in neonatal rats. Stem Cells. 2009;27:478–88. DOI:10.1634/stemcells.2008-0333.
92. Ridzuan N, Al Abbar A, Yip WK, Maqbool M, Ramasamy R. Characterization and Expression of Senescence Marker in Prolonged Passages of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Stem Cells Int. 2016;2016:8487264. DOI:10.1155/2016/8487264.
 93. Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. Stem Cells. 2001;19:219–25. DOI:10.1634/stemcells.19-3-219.
 94. Nandra KK, Takahashi K, Collino M, Benetti E, Wong WS, Goh FY, et al. Acute treatment with bone marrow-derived mononuclear cells attenuates the organ injury/dysfunction induced by hemorrhagic shock in the rat. Shock. 2012;37(6):592-8. DOI:10.1097/SHK.0b013e31824e4c0d.
 95. Ode A, Schoon J, Kurtz A, Gaetjen M, Ode JE, et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. Eur Cell Mater. 2013;25:37-47. PMID:23300031.
 96. Lin Y, Leu S, Sun CK, Yen C, Kao Y, Chang L et al. Early Combined Treatment with Sildenafil and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Preserves Heart Function in Rat Dilated Cardiomyopathy. J Transl Med. 2010;26:8–88. DOI:10.1186/1479-5876-8-88.
 97. Reich CM, Raabe O, Wenisch S, Bridger PS, Kramer M, Arnhold S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells--a comparative study. Vet Res Commun. 2012;36(2):139-48. DOI:10.1007/s11259-012-9523-0.

-
98. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;57:250–62. PMID:2208806.
 99. Sun C, Chang L, Sheu J, Chiang C, Lee F, Wu C et al. Bone Marrow–derived Mononuclear Cell Therapy Alleviates Left Ventricular Remodeling and Improves Heart Function in Rat-Dilated Cardiomyopathy. *Crit Care Med.* 2009;37:1197–05. DOI:10.1097/CCM.0b013e31819c0667.
 100. Vicario J, Piva J, Pierini A, Ortega HH, Canal A, Gerardo L, et al. Transcoronary sinus delivery of autologous bone marrow and angiogenesis in pig models with myocardial injury. *Cardiovasc Radiat Med.* 2002;3(2):91-4. PMID:12699838.
 101. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 2002;106(24):3009-17. PMID:12473544.
 102. Jekl V, Hauptman K, Jeklová E, Knotek Z. Blood sampling from the cranial vena cava in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Lab Anim.* 2005;39(2):236-9. DOI:10.1258/0023677053739774.
 103. Lovell MJ, Yasin M, Lee KL, Cheung KK, Shintani Y, Collino M, et al. Bone marrow mononuclear cells reduce myocardial reperfusion injury by activating the PI3K/Akt survival pathway. *Atherosclerosis.* 2010;213(1):67-76. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.045.
 104. Horii T, Tambara K, Nishimura K, Suma H, Komeda M. Residual fibrosis affects a long-term result of left ventricular volume reduction surgery for dilated cardiomyopathy in a rat experimental study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26(6):1174-9. DOI:10.1016/j.ejcts.2004.06.023.

105. Gho JM, Kummeling GJ, Koudstaal S, Jansen Of Lorkeers SJ, Doevendans PA, Asselbergs FW et al. Cell therapy, a novel remedy for dilated cardiomyopathy? A systematic review. *J Card Fail.* 2013;19:494-02. Review. DOI:10.1016/j.cardfail.2013.05.006.
106. Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(10):942-53. DOI:10.1016/j.jacc.2011.11.029.
107. Radrizzani M, Lo Cicero V, Soncin S, Bolis S, Sürder D, Torre T, et al. Bone marrow-derived cells for cardiovascular cell therapy: an optimized GMP method based on low-density gradient improves cell purity and function. *J Transl Med.* 2014;12:276. DOI:10.1186/s12967-014-0276-0.
108. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol.* 2015;185(10):2596-606. DOI:10.1016/j.ajpath.2015.06.001.
109. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17(4):761-73. DOI:10.1089/scd.2007.0217.
110. Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells.* 2014;7(2):135-42. DOI:10.15283/ijsc.2014.7.2.135.
111. Im GI. Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. *J Biomed Mater Res A.* 2017;105(9):2640-2648. DOI:10.1002/jbm.a.36089. Review.
112. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties,

- differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 2009;132(5):533-46. DOI:10.1007/s00418-009-0629-6
113. Mantovani C, Raimondo S, Haneef MS, Geuna S, Terenghi G, Shawcross SG, et al. Morphological, molecular and functional differences of adult bone marrow- and adipose-derived stem cells isolated from rats of different ages. *Exp Cell Res.* 2012;318(16):2034-48. DOI:10.1016/j.yexcr.2012.05.008.
114. Ishida M, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Hamamoto M, Nagaya N et al. Bone marrow-mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23:436-45. DOI:10.1016/S1053-2498(03)00220-1.
115. Sun C, Chang L, Sheu J, Chiang C, Lee F, Wu C et al. Bone Marrow-derived Mononuclear Cell Therapy Alleviates Left Ventricular Remodeling and Improves Heart Function in Rat-Dilated Cardiomyopathy. *Crit Care Med.* 2009;37:1197-05. DOI:10.1097/CCM.0b013e31819c0667.
116. Jin B, Luo XP, Ni HC, Li Y, Shi HM. Cardiac matrix remodeling following intracoronary cell transplantation in dilated cardiomyopathic rabbits. *Mol Biol Rep.* 2010;6:3037-42. DOI:10.1007/s11033-009-9874-y.
117. Roura S, Planas F, Prat-Vidal C, Leta R, Soler-Botija C, Carreras F et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation. *Eur J Heart Fail.* 2007;10:995-02. DOI:10.1016/j.ejheart.2007.07.008.
118. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 2004;110:1209-12. DOI:10.1161/01.CIR.0000136813.89036.21.
119. Neglia D, Michelassi C, Trivieri MG, Sambuceti G, Giorgetti A, Pratali L et al. Prognostic role of myocardial blood flow impairment in idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2002;105:186-93. PMID:11790699.

120. Roson-Burgo B, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo C, De Las Rivas J. Insights into the human mesenchymal stromal/stem cell identity through integrative transcriptomic profiling. *BMC Genomics*. 2016;17:944. DOI:10.1186/s12864-016-3230-0.
121. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*. 2012;244-58. DOI:10.1016/j.stem.2012.02.005. Review.
122. Karantalis V and Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*. 2015; 1413-30. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614.
123. Wang M, Zhang G, Wang Y, Liu T, Zhang Y, An Y et al. Crosstalk of mesenchymal stem cells and macrophages promotes cardiac muscle repair. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;53-61. DOI:10.1016/j.biocel.2014.11.003.
124. Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero M, Pan M, Suárez de Lezo J Jr, Carmona MD et al. Functional improvement in patients with dilated cardiomyopathy after the intracoronary infusion of autologous bone marrow mononuclear cells. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2013;66:450–57. DOI:10.1016/j.rec.2012.11.013.
125. Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, Martinelli V, Ruozi G, Pelos B et al. In vivo therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. *Stem Cell Reports*. 2015; 332-9. DOI:10.1016/j.stemcr.
126. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S et al. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1 year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *CircHeartFail*. 2009;2:417–23. DOI:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.855023.

Anexo



Intramyocardial bone marrow mononuclear cells versus bone marrow-derived and adipose mesenchymal cells in a rat model of dilated cardiomyopathy

M DOLORES CARMONA^{1,2,3}, SAGRARIO CAÑADILLAS^{1,2,3}, MIGUEL ROMERO^{1,3,4}, ALFONSO BLANCO⁵, SONIA NOGUERAS^{1,2,3,†} & CONCHA HERRERA^{1,2,3,6,†}

¹Maimonides Institute of Biomedical Research in Cordoba (IMIBIC), Spain, ²Cellular Therapy Unit, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, ³University of Cordoba, Spain, ⁴Cardiology Department, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, ⁵Anatomy and Comparative Pathology Department, University of Cordoba, Spain, and ⁶Hematology Department, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

Abstract

Background. Effects of cell therapy on dilated cardiomyopathy (DCM) have been investigated in pre-clinical models using distinct cellular types in each study. A single study that compares the effectiveness of different cells is lacking. **Methods.** We have compared the effects of intramyocardial injection (IMI) of bone marrow (BM)-derived mononuclear cells (MNCs), BM and adipose tissue (AT) mesenchymal stromal cells (BM-MSCs and AT-MSCs) on heart function, histological changes and myocardial ultrastructure in a rat model of DCM. Isogenic Wistar rats were used to isolate the different cell types and to induce DCM by autoimmune myocarditis. Animals were randomly assigned to receive BM-MNCs, BM-MSCs, AT-MSCs or placebo at day 42 by IMI. Serial echocardiography was used to assess cardiac function and hearts obtained after sacrifice at day 70, were used for histological and ultrastructural analysis. Serum levels of type B-natriuretic peptide (BNP) and vascular endothelial growth-factor (VEGF) were determined at different time points. **Results.** BM-MSC treatment induced significant improvement in ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), left ventricular systolic diameter (LVESD) and systolic volume (LVESV). In contrast, changes in echocardiographic parameters with respect to pre-treatment values in animals receiving placebo, AT-MSCs or BM-MNCs were not statistically significant. EF and FS in animals receiving AT-MSCs were superior to those receiving placebo. BM-MSC transplantation induced also improvement in cardiac fibers organization and capillary density, fibrotic tissue reduction, increase in final VEGF concentration and BNP decrease. **Discussion.** IMI of BM or AT-MSCs improves LV function and induces more angiogenesis processes than BM-MNCs. In addition, BM-MSCs showed more anti-fibrotic effects and more ability to reorganize myocardial tissue compared with the other cell types.

Key Words: animal model, dilated cardiomyopathy, growth factor, myocardial fibers organization, neovascularization, stem cell transplantation

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) remains an important cause of heart failure in spite of notable advances in pharmacological and surgical treatment, and eventually constitutes one of the major indications for heart transplantation. The disease is characterized by loss of cardiomyocytes that are replaced by fibrosis and, therefore, the restoration of the lost myocardium appears as a very desirable end-point of therapy.

Stem cells transplantation has been intensively investigated, aiming to restore the myocardium mainly in ischemic heart disease both in the clinical [1,2] and

pre-clinical [3] settings. Many fewer studies have been conducted on cell therapy for DCM using bone marrow-derived mononuclear cells (BM-MNCs) [4–9], bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) [10–14] and adipose tissue-derived mesenchymal cells (AT-MSCs) [15–17] among other cellular types. Both clinical and pre-clinical studies have reported a modest to moderate improvement of left ventricular (LV) function after cell therapy for DCM with an acceptable safety profile [18]. However, large heterogeneity among cellular types, doses of cells, animal models, administration route and time to follow-up make it very difficult to elucidate whether there is a role for

[†]These authors contributed equally to this work.

Correspondence: M Dolores Carmona, Cellular Therapy Unit, Reina Sofia University Hospital, Avenida Menéndez Pidal s/n, CP 14004 Córdoba, Spain. E-mail: mariad.carmona.luque@juntadeandalucia.es

(Received 3 February 2017; accepted 15 May 2017)

ISSN 1465-3249 Copyright © 2017 International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.05.006>

cellular therapy in DCM. In particular, the cellular types used in pre-clinical models have been chosen searching for different mechanisms of action that include differentiation of stem cells into cardiomyocytes, paracrine secretion of anti-apoptotic and growth factors or angiogenesis. BM-MNCs and mesenchymal stromal cells (MSCs), both of bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) origin, have been demonstrated to exert all of these potential mechanisms of action in animal models and are, therefore, strong candidates for cell-based cardiac repair, but a direct comparison between their effects on DCM is lacking.

The aim of the present work was to compare the effects of intramyocardial injection (IMI) of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs on heart function, histological changes and myocardial ultrastructure in a model of DCM in rats.

Material and methods

Experimental design and DCM model

Experiments were performed on pathogen-free 8-week-old male isogenic Wistar rats. Animals were housed in the facilities of the Maimonides Institute for Biomedical Research in an air-conditioned room, with light-dark cycle and *ad libitum* food and drink. Aiming to emulate the autologous framework, BM and AT were obtained from donor rats and administered to isogenic recipients.

DCM was induced in 66 rats that were previously randomized into four groups to determine the initial physiological and echocardiographic characteristics from each animal (placebo group, $n = 16$; BM-MNC group, $n = 16$; AT-MSC group, $n = 17$; BM-MSC group, $n = 17$). DCM was induced through experimental autoimmune myocarditis (EAM) with porcine cardiac myosin as antigen [12,19,20]. For this purpose, incomplete Freund's Adjuvant (Difco) was completed with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra desiccated (Difco) at a final concentration of 1.0 mg/mL. Then 0.1 mL of complete Freund's Adjuvant was mixed with an equal volume of porcine cardiac myosin (Sigma) containing 1 mg of the antigen. This mixture was injected into the footpad of 66 male Wistar rats on day 0 and day 7 to induce the autoimmunization process. Six rats (9.1%) died between days 21 and 28 after immunization [21].

On day 42 after DCM induction, 60 surviving rats served as models for heart failure due to DCM. IMIs were administered to animals previously randomized: Group 1, placebo: 100 μ L saline ($n = 14$); Group 2, BM-MNCs: 5×10^6 cells in 100 μ L saline ($n = 14$); Group 3, AT-MSCs: 5×10^6 cells in 100 μ L saline ($n = 16$); and Group 4, BM-MSCs: 5×10^6 cells in 100 μ L saline ($n = 16$).

All rats were sacrificed on day 70 after DCM induction (28 days after cell suspension or placebo

injection). Hearts were collected for either histopathologic or electron microscopy study. All studies were blinded.

Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Reina Sofia Hospital and developed under European (86/609/European Economic Community, 24 November 1986) and Spanish (Decree 214/1997 of July 30th) regulations for animal stabling, handling, experimentation and other scientific purposes. All animals were treated humanely in accordance with Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Isolation of BM-MNCs

Donor healthy male Wistar rats ($n = 17$) were anesthetized by intraperitoneal (IP) injection of thiopental (50 mg/kg) and humanely killed by exsanguination. Femurs and tibiae were extracted and BM was harvested by flushing both bones with phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco). The cell suspension was filtered through a 100- μ m filter (Falcon Corning) and transferred to a sterile tube containing PBS with penicillin/streptomycin. BM-derived MNCs were isolated by Ficol density gradient centrifugation (Lymphoprep). Final cell suspension was washed to remove Ficol and resuspended with PBS to obtain a final concentration of 5×10^6 cells in 100 μ L. BM-MNCs from one donor rat were used to treat one DCM-induced rat.

Expansion of BM and AT-MSCs

BM from healthy male Wistar rats ($n = 16$) was collected as described above. The unfractionated homogeneous cell suspension obtained from BM was transferred to a sterile tube containing PBS with penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL), filtered through a 100- μ m filter (Falcon Corning), washed and filtered once again through a 40- μ m filter (BD Biosciences). The final cell suspension was resuspended in α -minimal essential medium (α -MEM; Lonza) enriched with 15% of fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100 U/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin, 2 mmol/L of glutamine (Lonza) and 1 ng/mL of rat Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2; Sigma-Aldrich) [22,23].

To obtain AT, donor healthy male Wistar rats ($n = 16$) were anesthetized by IP injection with thiopental (50 mg/kg) and humanely killed by exsanguination. Subcutaneous AT was extracted from inguinal fat and transferred to a sterile tube containing PBS with penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) [24]. AT was minced and digested in a Collagenase Type I solution (Sigma) under constant agitation at 37°C. The digested tissue was washed with FBS to neutralize collagenase action and filtered through 100- μ m filters (BD Biosciences). The final cell suspension was resuspended in α -MEM supplemented with FBS,

Comparison of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs in rat dilated cardiomyopathy 949

antibiotics, ultra-glutamine and rat FGF-2. BM and AT-derived cell suspensions were seeded in 25 cm² and 75 cm² culture flasks (Nunc, Thermo Scientific), respectively, and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Non-adherent cells were removed after 3 days and culture medium was refreshed at 2- to 3-day intervals. When cell culture reached 80% of confluence, cells were harvested by trypsinization (Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], Sigma), re-seeded in new flasks and expanded up to passage two for BM-MSCs and passage five for AT-MSCs.

Flow cytometry

BM-MNCs were phenotypically analyzed using conjugated mouse monoclonal antibodies, anti-rat CD34 (Santa Cruz Biotechnology) and CD45 (BD Pharmingen), and conjugated rabbit polyclonal antibodies anti-rat c-kit (or CD117; LifeSpan Biosciences) and CD133 (Novus Biologicals). BM-MSCs and AT-MSCs were analyzed using mouse monoclonal antibodies anti-rat CD34 (Santa Cruz, Biotechnology), CD45 and CD90 (BD Pharmingen), and hamster monoclonal antibody anti-rat CD29 (BD Pharmingen). Cell samples were acquired on a MACSQUANT flow cytometer from Miltenyi-Biotec (BergischGladbach) and analyzed using MACSQuantify software, Version 2.5. At least 100.000 events were analyzed for each marker.

Assessment of MSC differentiation capacity

BM-MSCs and AT-MSCs were differentiated to adipocytes and osteocytes by using adipocyte differentiation media and osteocyte differentiation media (Lonza). The differentiation process was carried out for 2 weeks. Then cells were stained with oil red (Sigma) for adipocytes and with alizarin red (Sigma) for osteocytes. Cells were observed under a light microscope (Nikon Eclipse TE2000-S). Images were digitalized by the NIS-Elements software, version 3.2, and five digitalized images were analyzed from each stained culture.

Cell transplantation

On day 42, 5×10^6 cells or placebo were injected intramyocardially. We select BM-MSCs at passage two and AT-MSCs at passage five because at this point cell populations were phenotypically and functionally the most homogeneous (see results of characterization of the cell grafts).

DCM rats were anesthetized by inhalation with sevoflurane (6% for induction, 3% for maintenance). The anesthetized rats were endotracheally intubated and positive-pressure ventilation was maintained using a Small Animal Ventilator (Harvard Apparatus) with a respiratory rate of 110 cycles/min and a volume of

2.5 L gas mixture input (O₂/sevoflurane). Heart was exposed via left thoracotomy with an incision of 2.5 cm approximately under sterile conditions. Then 5×10^6 cells [12] resuspended in 100 µL of saline or 100 µL of saline as placebo were injected into two points of the middle region and two points of the apical region of the LV myocardium. Injections were performed using a 27-gauge needle with a Hamilton-syringe. Fentanyl citrate (0.02 mg/kg) was administered IP as preoperative analgesic before thoracotomy and buprenorphine (0.05 mg/kg) was administered at the end of the postoperative period. A total of nine rats died after IMI of cell product (one rat from the BM-MNC group, six rats from the AT-MSC group and two rats from the BM-MSC group) and one rat died after injection of placebo.

Functional assessment by echocardiography

Transthoracic echocardiography [25,26] was performed on day 0 before DCM induction, on day 42 before treatment administration and on day 70 before sacrifice. Rats were anesthetized by inhalation with sevoflurane and placed in *lateral decubitus* position. Echocardiography was performed with an 8.9-MHz transducer (Acuson x300 ultrasound system Release 2.0, Siemens Health Global). M-mode tracing of LV was obtained by imaging of the heart beating in 2-dimensional mode. LV end-diastolic diameter (LVEDD), LV end-systolic diameter (LVESD) and fractional shortening percentage (FS) were measured using at least three consecutive cardiac cycles. Ejection fraction (EF) [16] was calculated as follows: $\%EF = [(LVEDD^{exp3} - LVESD^{exp3}) / LVEDD^{exp3}] \times 100$. LV end-diastolic volume (LVEDV) and LV end-systolic volume (LVESV) were also measured [27]. All echocardiographic studies were performed by one examiner blinded to treatments.

Heart and body weight

Initial body weight (BW) on day 0 before DCM induction, final BW on day 70, before sacrifice, and final heart weight (HW), after animals sacrifice, were registered from all studied animals. Final HW was measured and ratio of HW to final BW ($g \times Kg^{-1}$) was calculated [21].

Histopathology

On day 70, a total of 38 rat hearts from all treatment groups was collected for histological studies: control group, n = 10; BM-MNC group, n = 10; AT-MSC group, n = 7; and BM-MSC group, n = 11. For this purpose, animals were deeply anesthetized with IP thiopental (50 mg/kg). Hearts were blocked in diastolic phase with potassium chloride (Sigma), washed

with PBS, fixed by perfusion with 4% buffered paraformaldehyde and excised. The removed hearts were cut into transverse slices in the mid-ventricle and embedded in paraffin. Several 5- μ m sections were cut and stained with hematoxylin and eosin for histological examination, with Masson's Trichrome staining to detect fibrosis in cardiac muscle and with α -smooth muscle actin (α -SMA) by immunohistochemistry to quantify myocardium capillaries density, using staining methods. Transverse stained sections were randomly observed with a Nikon Eclipse Ci microscope and images were computerized with NIS-Elements software, version 3.2. All studies were performed by two examiners who were blinded to treatment assignment.

To analyze fibrosis in complete myocardial sections, digitalized images were performed at a magnification of $\times 4$. To quantify fibrosis in cardiac muscle, 20 randomly selected fields per section were analyzed at a magnification of $\times 20$ and images were computerized. Standard morphometric quantification of collagen fraction with respect to total area of cardiac tissue from each digitalized image was performed by a method previously validated of color image analysis [28] using NIS-Elements software 3.2. Percentage of collagen in each section was obtained as the sum of all fibrotic areas with respect to the total myocardial area [12].

To quantify myocardium capillary density, immunohistochemical assessment of small blood vessels was performed using α -SMA staining. Hematoxylin was added as a counter-stain for nuclei. Ten randomly selected high-power fields (HPFs) with a magnification of $\times 20$ from each transverse stained section were observed and images were digitalized. Myocardium vessels with a diameter ≤ 25 μ m positively stained for α -SMA were counted using a validated counting method [29] with NIS-Elements software, version 3.2. Three stained sections per rat were analyzed. Total capillary numbers from each field were averaged and results were expressed as the number of capillary vessels per HPF $\times 20$.

Electron microscopy

On day 70, a total of 12 hearts (three rats per group) were subjected to electron microscopy examination. For this purpose, after blockage in diastolic phase with potassium chloride, hearts were washed with PBS and fixed with a 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 mol/L phosphate buffer pH 7.4 (Sigma) by perfusion. Excised hearts were cut into thin slices and immersed in fresh fixative solution for an additional 24 h at 4°C. Heart sections were washed several times with PBS, post-fixed in 1% (mass/volume) osmium tetroxide in distilled water, dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in epoxy resin. The embedded sections were sliced into ultrathin sections of 0.1 μ m with a LKB III ultramicrotome and stained with saturated

uranyl acetate and lead citrate for microscopic examination. Ultrastructural analysis of myocardium muscle fibers was performed using a Jeol Jem 1400 high-resolution transmission electron microscope. Thirty photomicrographs per group were observed to analyze the ultra-morphological characteristics of muscle fibers present in each studied group. This study was carried out by two blinded examiners, and similar results were obtained from both.

The percentage of fiber types in each treatment group had been calculated. For this purpose, heart sections were fixed and placed on copper grids for electron microscopy examination. It is known that a grid is formed by a mesh consisting of 200 holes, and the dimensions of one hole is 100 μ m² (10 μ m \times 10 μ m). We counted the total number of each fiber type in 10 holes randomly selected per group and then we calculated the percentage of each fiber types in each treatment group.

Measurement of vascular endothelial growth factor and type B-natriuretic peptide serum concentrations

For serum vascular endothelial growth factor (VEGF) determination, blood was collected from every rat at four time points: on day 0 before immunization, 5 weeks after immunization on day 42 before IMIs of cellular product or placebo, 24 h post-transplantation on day 43 and just before sacrifice on day 70. For serum Type B-Natriuretic Peptide (BNP) determination, blood was collected from every rat at three time points: on day 0 before immunization, on day 42 before treatment administration and on day 70 just before sacrifice.

For blood collection, rats were anesthetized by inhalation with sevoflurane and 1 mL of blood sample was obtained from subclavian vein. Samples were centrifuged and serum was collected and preserved at -80°C . After thawing, determination of VEGF and BNP serum level were performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (RayBiotech) following their provided protocols. The minimum detectable dose of VEGF and BNP concentration was 2 pg/mL and 1.6 pg/mL, respectively.

Statistical analysis

All data were expressed as mean \pm standard deviation (SD), unless otherwise indicated.

Because of the small sample size, nonparametric statistical analysis was used. Comparisons of parameters between all groups were made with the Kruskal-Wallis test, and between two groups they were made with the Mann-Whitney *U* test. Intra-individual comparison of baseline versus follow-up was analyzed using non-parametric Wilcoxon test. Statistical significance was accepted when P was ≤ 0.05 . All analyzes were performed with PASW Statistic 18 (IBM SPSS) software.

Results

Characterization of the cell grafts

BM-MNCs ($n = 16$) mainly express CD45 and a normal percentage of CD34, CD133 and CD117 markers (Figure 1).

According to previous *in vitro* studies, passage two for BM-MSC ($n = 17$) and passage five for AT-MSC ($n = 17$) were selected for transplantation because at this point cells were homogeneously positive (>95%) for CD29 and CD90 and negative (<5%) for CD34 and CD45 (Figure 2) and, regarding the differentiation capacity, after 2 weeks of culture in adipogenic and osteogenic inductive media, the staining with oil-red and alizarin-red showed homogeneous lipid-laden adipocytes and calcium deposits, respectively (data not shown).

Echocardiographic assessment of heart function

Baseline measurement results of echocardiograms (day 0) were normal in all three groups of rats.

Five weeks after DCM induction (day 42) the 60 surviving animals exhibited echocardiographic signs of LV dysfunction consisting of a significant decrease in EF and FS as well as an increase in LV end-diastolic and end-systolic diameters and volumes with respect to basal values ($P \leq 0.018$).

Four weeks after cell injection (day 70) echocardiographic assessment of heart function revealed that animals receiving intramyocardial BM-MSCs ex-

hibited changes with respect to their pretreatment values consisting of a significant increase in EF ($P = 0.012$) and FS ($P = 0.012$) as well as a significant decrease in LVESD ($P = 0.012$) and LVESV ($P = 0.012$). In contrast, the changes in echocardiographic parameters with respect to pretreatment values observed in animals receiving placebo, AT-MSCs or BM-MNCs were not statistically significant (Figure 3).

As a result, the comparison between the echocardiographic parameters observed in the four groups on day 70 showed significant differences consisting of higher EF and FS and lower LVESV and LVESD in the BM-MSC group with respect to controls and also with respect to animals treated with BM-MNCs (Table I). The AT-MSC group showed significantly higher EF and FS than controls without differences in the remaining parameters of heart function.

Figure 4 shows the net increase/decrease (Δ) experienced by each echocardiographic parameter between days 42 and 70.

BW and HW

At day 70, the final BW of all DCM rats was significantly higher than their initial BW ($P \leq 0.018$; Table II). The increase in the final BW (day 70) with respect to the initial BW (day 0) in the AT-MSC group was significantly higher in comparison with the BM-MNC-treated group (0.101 ± 0.021 kg; $P = 0.006$) and with

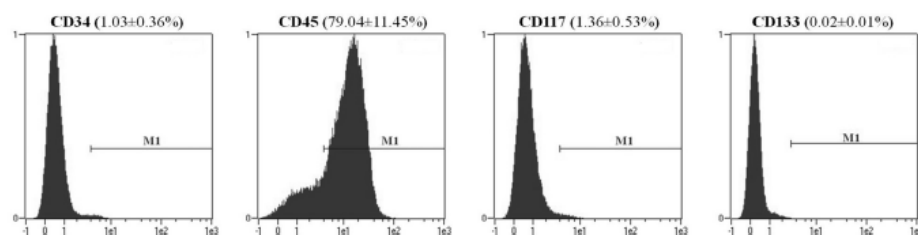


Figure 1. Histogram derived from flow cytometric analysis of the BM-MNC population from healthy donor Wistar rats. Data are mean \pm SD.

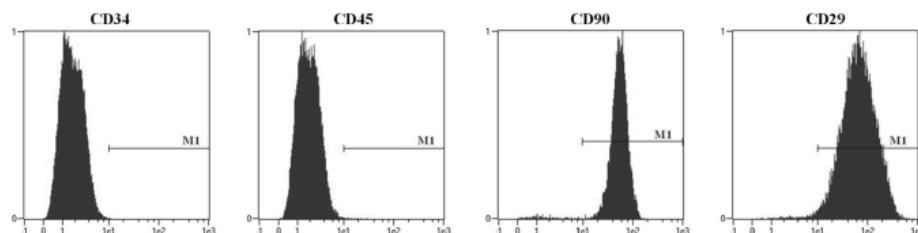


Figure 2. Histogram derived from flow cytometric analysis of BM-MSC and AT-MSC populations from healthy donor Wistar rats, cultured from passage one to passage five.

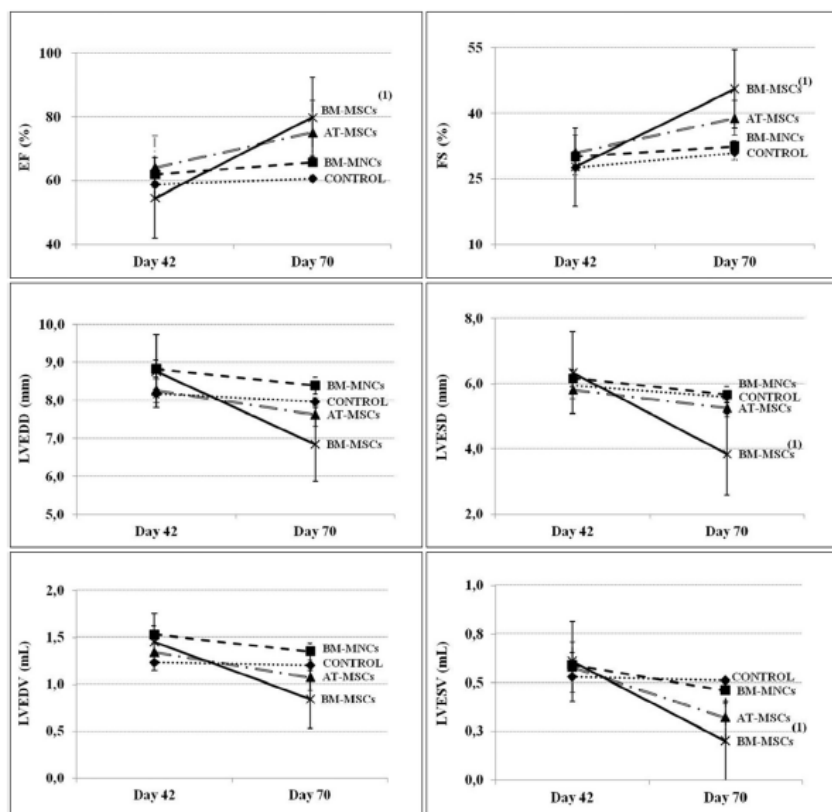


Figure 3. Evolution of echocardiographic parameters since day 42, before treatment administration, until day 70, before humane killing in control group and the BM-MNC, AT-MSC and BM-MSCs groups. Data are mean \pm SD [1]. $P < 0.05$ versus before treatment.

the BM-MSC-treated group (0.108 ± 0.027 kg; $P = 0.015$). HW and ratio ($HW \times BW^{-1}$) did not differ between the groups ($P > 0.05$).

Optical microscopy: histological study of heart tissue

Hematoxylin and eosin staining of heart sections (Figure 5A) from the control group revealed mostly degenerative necrotic cardiac fibers with nuclei irregularly distributed and large scarring areas in the endocardium and epicardium regions, with extensive collagen fibers that compress cardiac fibers and vessels. Myocardial sections from BM-MNC-treated rats showed reduced scarring areas, necrotic and degenerative cardiac fibers and a large number of myocardial fibers with central nuclei surrounded by myofibrils and transverse striation. In AT-MSC-treated rats it was evidenced as a slight reduction in

necrotic and scarring areas, many degenerative cardiac fibers with a similar location to controls and few normal cardiac fibers showing central nuclei, contractile components and visible transverse striation. In contrast, histological examination of hearts from the BM-MSC-treated group mainly showed normal cardiac fibers with central nuclei, well-developed myofibrils, well-organized transverse striation and reduced scarring and necrotic areas.

Figure 5B and 5C shows representative photographs of thin sections of the hearts stained with Masson's Trichrome. Quantitative analysis of myocardial fibrosis (Figure 5D) showed that collagen fraction was significantly lower in animals treated with BM-MSCs ($0.009 \pm 0.01\%$) in comparison with animals treated with placebo ($2.77 \pm 1.1\%$; $P \leq 0.050$), BM-MNCs ($0.33 \pm 0.1\%$; $P \leq 0.050$) and AT-MSCs ($2.07 \pm 2.0\%$; $P \leq 0.050$).

Comparison of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs in rat dilated cardiomyopathy 953

The number of small vessels per HPF x20 assessed with α -SMA immunohistochemical staining (Figure 6A) was significantly higher in rats treated with BM-MSCs in comparison with both controls (98.25 ± 41.38 versus 14.64 ± 10.18 ; $P = 0.008$) and the BM-MNC treated group (41.17 ± 29.95 ; $P = 0.042$) and was also higher than that observed in the AT-MSCs-treated animals (43.83 ± 36.21) although this difference did not reach statistical significance ($P = 0.077$; Figure 6B).

Electron microscopy: myocardium ultrastructure study

When myocardial sections were assessed using electron microscopy, four types of myocardial fibers could be observed (Figure 7), which we conventionally defined as follows: (1) type 1 were degenerative fibers in necrosis stage; (2) type 2 were degenerative fibers with a partial loss of myofibrils and mitochondria, as well as swollen endoplasmic reticulum and Golgi apparatus due to extracellular fluid entry; (3) type 3 were regenerative cardiac fibers that showed occasional degenerative myofibrils, an increased mitochondrial concentration with normal cristae and irregular accumulations of desmosomes not reassembled as main characteristic; and (4) type 4 cardiac fibers were defined as completely regenerated and conserved muscle fibers with well-organized myofibrils, high concentration of mitochondria with normal cristae and desmosomes well aligned in a transverse band forming intercalated disks.

Analyzing these ultrastructural findings per group, we observed that in the control group muscle fibers showed the most myofibrils in the necrosis stage (type 1 = 49.8%) and degenerated myofibrils (type 2 = 30.3%). There were small preserved areas with cardiac fibers type 3 and type 4 but these areas were much more reduced than the impaired areas (Table III).

In contrast, in myocardial section from rats treated with MSCs from both BM and AT, most myofibrils were undergoing regeneration (type 3) and regenerated (type 4) (Table III). Degenerated and necrotic myofibrils (types 1 and 2) were rarely observed in these groups. The BM-MNC-treated group exhibited intermediate ultrastructural characteristics between controls and MSC-treated animals (Table III).

These results from the ultrastructure analysis, although limited by the low number of studied samples (three rats per group), seems to corroborate the histological findings, showing dramatic differences between controls and MSC-treated rats from both BM and AT origins, whereas animals receiving BM-MNCs also exhibited myocardial regeneration but to a lesser extent.

VEGF serum concentration

Baseline serum concentration of VEGF remains unchanged in the four groups in comparison with the point of maximum damage after DCM induction, immediately before cellular or placebo injections ($P > 0.05$). Twenty-four hours post-intervention, serum VEGF levels increased in the four groups, with the highest concentration observed in the BM-MNC-treated group (148.96 ± 29.85 pg/mL) and this difference was statistically significant in comparison with all the other study groups (controls: 72.90 ± 46.73 pg/mL, $P = 0.001$; AT-MSCs group: 104.95 ± 32.76 pg/mL, $P = 0.011$; and BM-MSCs group: 100.00 ± 22.01 pg/mL, $P = 0.010$). Before sacrifice, 4 weeks after placebo or cellular injection, final VEGF levels decreased for all groups. However, this final VEGF concentration was significantly higher in the three groups receiving cellular injections in comparison with controls in which VEGF levels

Table I. Echocardiographic parameters value.

| Study groups | | EF (%) | FS (%) | LVEDD (mm) | LVESD (mm) | LVEDV (mL) | LVESV (mL) |
|--|---------|---|---|---------------|--|---------------|--|
| Pre-treatment (d 42) | Control | 58.7 ± 7.6 | 27.5 ± 3.4 | 8.2 ± 0.7 | 5.9 ± 0.8 | 1.2 ± 0.3 | 0.5 ± 0.2 |
| | BM-MNCs | 61.9 ± 5.4 | 30.2 ± 3.6 | 8.8 ± 1.3 | 6.2 ± 1.1 | 1.5 ± 0.6 | 0.6 ± 0.3 |
| | AT-MSCs | 64.1 ± 16.7 | 32.0 ± 12.1 | 8.2 ± 1.7 | 5.8 ± 1.8 | 1.3 ± 0.5 | 0.6 ± 0.3 |
| | BM-MSCs | 54.6 ± 5.5 | 27.7 ± 3.1 | 8.8 ± 0.5 | 6.3 ± 0.5 | 1.4 ± 0.2 | 0.6 ± 0.1 |
| Final (d 70) | CONTROL | 60.5 ± 9.3 | 31.0 ± 9.2 | 7.9 ± 1.6 | 5.6 ± 1.7 | 1.2 ± 0.6 | 0.5 ± 0.3 |
| | BM-MNCs | 65.8 ± 5.6 | 32.5 ± 3.5 | 8.4 ± 1.2 | 5.7 ± 0.9 | 1.3 ± 0.5 | 0.5 ± 0.2 |
| | AT-MSCs | 75.1 ± 13.7^a | 38.9 ± 9.4^a | 7.6 ± 1.6 | 5.3 ± 1.6 | 1.1 ± 0.6 | 0.3 ± 0.2 |
| | BM-MSCs | $79.8 \pm 11.7^{b,c}$ | $45.6 \pm 9.4^{b,c}$ | 6.8 ± 1.8 | $3.8 \pm 1.5^{b,c}$ | 0.8 ± 0.6 | $0.2 \pm 0.2^{b,c}$ |
| P^d (Comparison of results between groups on day 70) | | (c) $P = 0.02$ (b) $P = 0.002$ (c) $P = 0.003$ | (c) $P = 0.05$ (b) $P = 0.007$ (c) $P = 0.001$ | $P = 0.299$ | (c) $P = 0.041$ (c) $P = 0.022$ | $P = 0.313$ | (c) $P = 0.036$ (c) $P = 0.030$ |

Echocardiographic parameters before cell treatment administration (d 42) and before humane killing (d 70). Data are mean \pm SD.

^a P versus controls.

^b P versus controls.

^c P versus BM-MNC group.

^dThe last row of the table (P) expresses the statistical signification of comparison between groups at day 70.

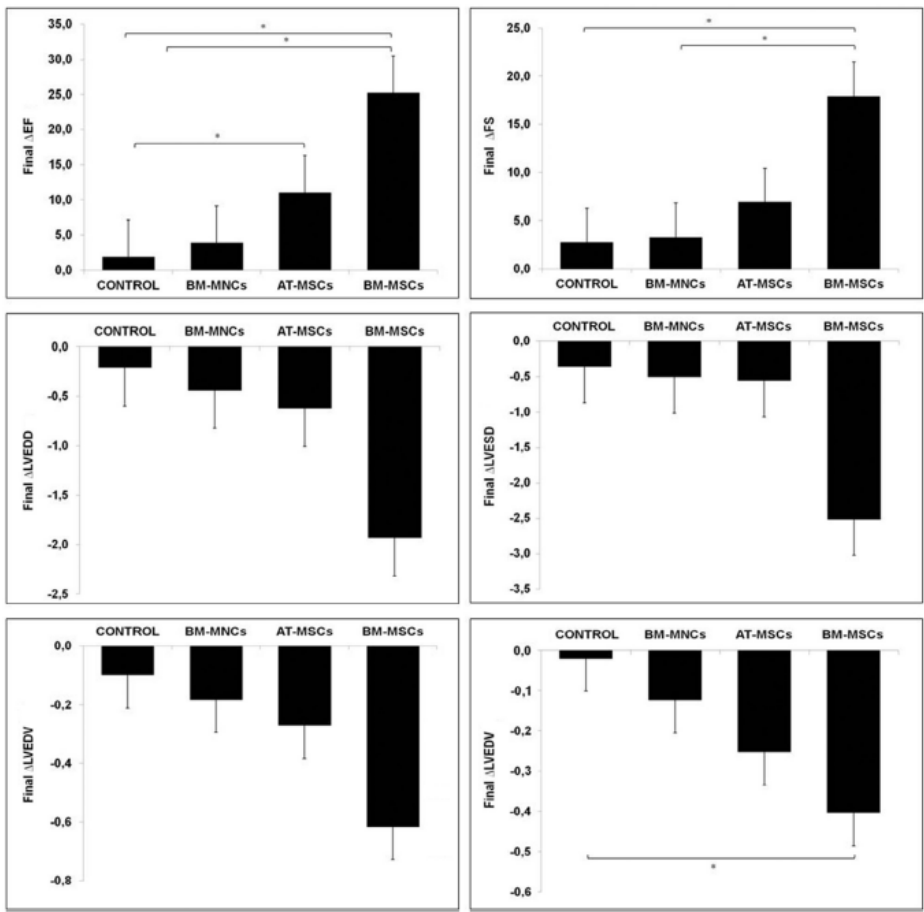


Figure 4. Final cardiac function recovery, on day 70, with respect to maximum point of injury on day 42, in all study groups, represented by echocardiographic parameters: EF, FS, LVEDD, LVESD, LVEDV and LVESV. Bars represent the net increase/decrease on day 70 with respect to pretreatment values on day 42. * $P < 0.05$ versus control and BM-MNC transplanted groups.

Table II. Effects of different treatments administered on BW (kg), HW (g) and ratio of HW to BW ($\text{g} \times \text{kg}^{-1}$) in DCM-induced rats.

| Physiological parameters | Control group | BM-MNCs group | AT-MSCs group | BM-MSCs group |
|--|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| Initial BW (kg) | 0.172 ± 0.015 | 0.181 ± 0.025 | 0.161 ± 0.025 | 0.176 ± 0.023 |
| Final BW (kg) | 0.283 ± 0.024 | 0.277 ± 0.041 | 0.299 ± 0.018 | 0.277 ± 0.002 |
| Final increased weight | 121.33 ± 28.98 | 100.73 ± 20.49 | $140.12 \pm 30.58^{a,b}$ | 108.00 ± 27.12 |
| HW (g) | 1.237 ± 0.264 | 1.293 ± 0.314 | 1.200 ± 0.213 | 1.254 ± 0.208 |
| Ratio ($\text{g} \times \text{kg}^{-1}$) | 4.385 ± 0.945 | 4.712 ± 1.206 | 3.999 ± 0.709 | 4.517 ± 0.732 |

Data are mean \pm SD. (Comparison between study groups).

^a P versus BM-MNC group: $P = 0.006$.

^b P versus BM-MSC group: $P = 0.015$.

Comparison of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs in rat dilated cardiomyopathy 955

Table III. Percentage of fiber types in each treatment group (%).

| Fiber type | Control | BM-MNC group | AT-MSC group | BM-MSC group |
|--------------------------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| Fiber type 1 (necrosis stage) | 49.84% | 12.61% | 5.51% | 4.50% |
| Fiber type 2 (degenerative stage) | 30.30% | 20.43% | 8.17% | 6.66% |
| Fiber type 3 (regenerative stage) | 9.53% | 26.81% | 44.60% | 45.02% |
| Fiber type 4 (regenerated stage) | 10.33% | 40.16% | 41.71% | 43.83% |

were undetectable (42.80 ± 34.92 pg/mL for the BM-MNC-treated group, $P < 0.0001$; 73.83 ± 13.53 pg/mL for the AT-MSC-treated group, $P < 0.0001$; and 57.30 ± 28.15 pg/mL for the BM-MSC-treated group, $P < 0.0001$; Figure 8A). Interestingly, at day 28 after intervention, VEGF serum levels remained increased from pre-intervention values in animals receiving AT-MSCs and BM-MSCs, whereas animals in the control and the BM-MNC groups showed VEGF levels similar or inferior to the baseline (Figure 8B).

BNP serum level

Baseline serum BNP levels were undetectable using ELISA (<1.66 pg/mL). Immediately before cellular or placebo injection, BNP levels had similarly increased in the four groups (3.83 ± 0.57 pg/mL in controls, 3.98 ± 1.22 pg/mL in the BM-MNC group, 4.46 ± 1.86 pg/mL in the AT-MSC group and 4.26 ± 0.75 pg/mL in the BM-MSC group; $P =$ non-significant [ns]). Four weeks after intervention final BNP serum levels in the controls (3.05 ± 0.68 pg/mL) and in the BM-MNC-treated rats (2.64 ± 0.23 pg/mL) remain significantly higher than those observed in the BM-MSC-treated rats (1.93 ± 0.26 pg/mL, $P \leq 0.05$, both cases). No significant differences were observed in the AT-MSC group (2.30 ± 0.59 pg/mL; Figure 8C).

Discussion

Our results demonstrate that IMI of expanded MSCs derived from BM and AT improves LV function and induces more angiogenesis processes than BM-MNCs in a DCM rat model. In addition, MSCs derived from BM have much better antifibrotic effects and more ability to reorganize myocardial tissue compared with the other cell types. This improvement correlates with changes at the histological and ultrastructural levels.

To carry out this study we have used an autoimmune injury model that has been demonstrated to induce myocarditis evolving to a chronic phase that resembles human DCM characterized by severe heart failure with impaired both systolic and diastolic func-

tion, and loss of muscle fibers replaced by diffuse and extensive fibrosis [20]. We performed cellular or placebo injections at day 42 because by this time the evolution of the histopathology has demonstrated healed myocarditis, namely, the disappearance of infiltrating MNCs and prominent fibrosis replacing the area of myocardial necrosis mimicking the histopathology of established human DCM.

Previous studies using the same or other pre-clinical models of DCM have reported improvement in cardiac function after transplantation of several types of cellular products. In a recent systematic review by Ghos *et al.* [18], 29 relevant articles reporting on cell therapy in animal models of DCM were examined. Twenty-four among 29 studies showed significant improvement in LV function ranging from 3% to 24% without any important adverse events. However, the large heterogeneity regarding the animal models (autoimmune myocarditis, doxorubicin-induced or genetically conditioned DCM), the cell types (nine different cell types used in these studies), the cell doses, the administration route (intracoronary, intravenous, intramuscular injection or sheet graft) and the study end-points make it difficult to obtain a robust conclusion about which cell type and which culture passage, if any, are the most effective in improving cardiac function due to DCM. In this sense, our work offers for the first time a direct comparison between the most usual types of cells used in previous studies, and reports on the advantages observed with the injection of BM-MSCs over the other two cellular types tested.

Regarding the ventricular function, we have used two measuring methods: pre-treatment versus follow-up (day +42 versus day +70) and control versus therapy (day +70). Our results demonstrated a net improvement in EF, FS, LVESD and LVESV over pre-treatment values after BM-MSC injection in contrast with animals receiving placebo, BM-MNCs or AT-MSCs that do not exhibit significant changes at day +70 in comparison with pre-treatment values on day +42 at the time of maximum damage. Consequently, the ventricular function at day +70 was significantly better in animals treated with BM-MSCs than in those treated with placebo or BM-MNCs. These results are comparable with those previously published by others, using each one as a single cellular type, for both BM-MSCs and BM-MNCs. Nagaya *et al.* [12], reporting on the injection of 5×10^6 BM-MSCs in a model of DCM after autoimmune myocarditis, found significant decreased LV end-diastolic pressure and increased LV maximum dP/dt (max LV contractility: pressure deviation [dP] respect time deviation [dt]) in comparison with controls. In contrast, a study [30] conducted in an animal model of doxorubicin-induced DCM found that systolic LV diameter, FS and end-diastolic pressure did not differ

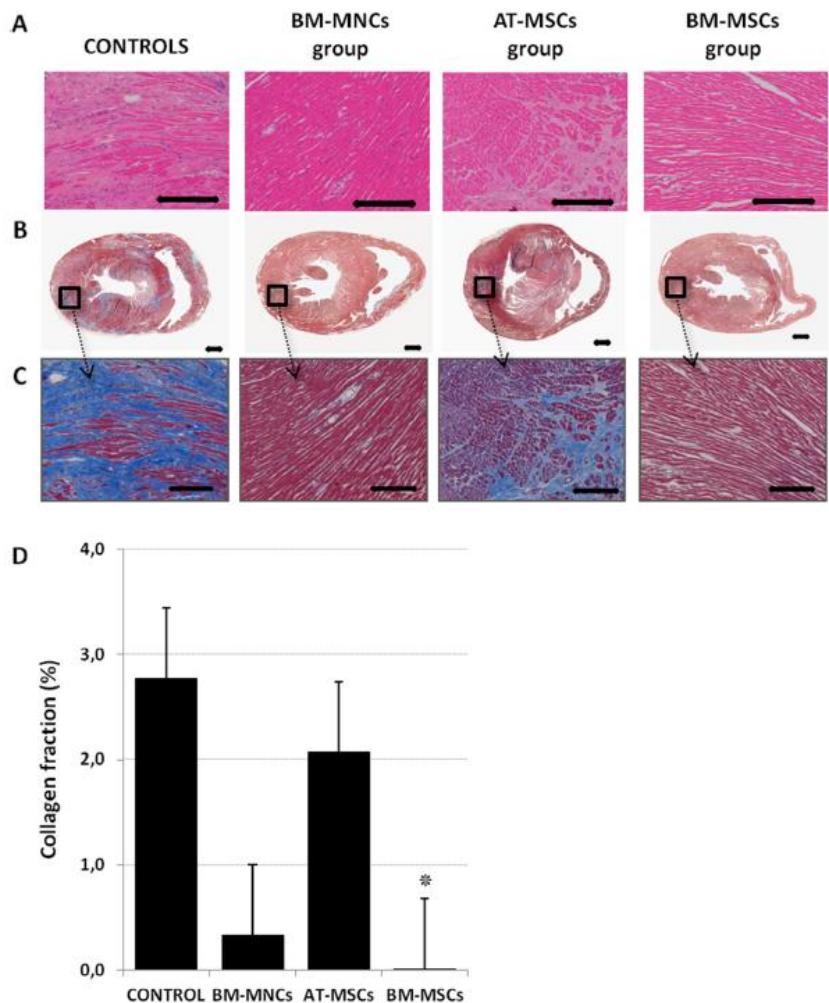


Figure 5. Histological study: effects on myocardial fibrosis and cardiac fiber organization of controls and the three types of cells injected. (A) Hematoxylin and eosin staining. Cardiac fiber organization in a representative myocardial sample of each treated group. Magnification $\times 20$. Scale bars = 100 μm . (B) Complete transversal rat heart sections stained with Masson's Trichrome staining (collagen-rich areas in blue and healthy myocardium in red). Magnification $\times 4$. Scale bars = 500 μm . (C) Masson's Trichrome staining. Fibrotic tissue included in myocardial sections from each treated group. Magnification $\times 20$. Scale bars = 100 μm . (D) Quantitative analysis of myocardial fibrosis: quantification of final collagen fraction (%) by standard morphometric quantification in myocardium of induced DCM rats treated with control, BM-MNCs, AT-MSCs or BM-MSCs. Collagen % = [μm^2 myocardium/ μm^2 collagen] $\times 100$. * $P \leq 0.05$ versus all other study groups.

significantly between animals receiving 1.2×10^6 MNCs and placebo [9], although secondary changes caused by doxorubicin-induced heart failure (decreased HW, development of ascites and increased atrial natriuretic peptide concentration) were most attenuated in

the transplanted group. On the other hand, with respect to the third type of cells included in our study, serial echocardiographic measurements in the present study demonstrated that the group receiving AT-MSCs exhibited an EF and FS at day +70 significantly

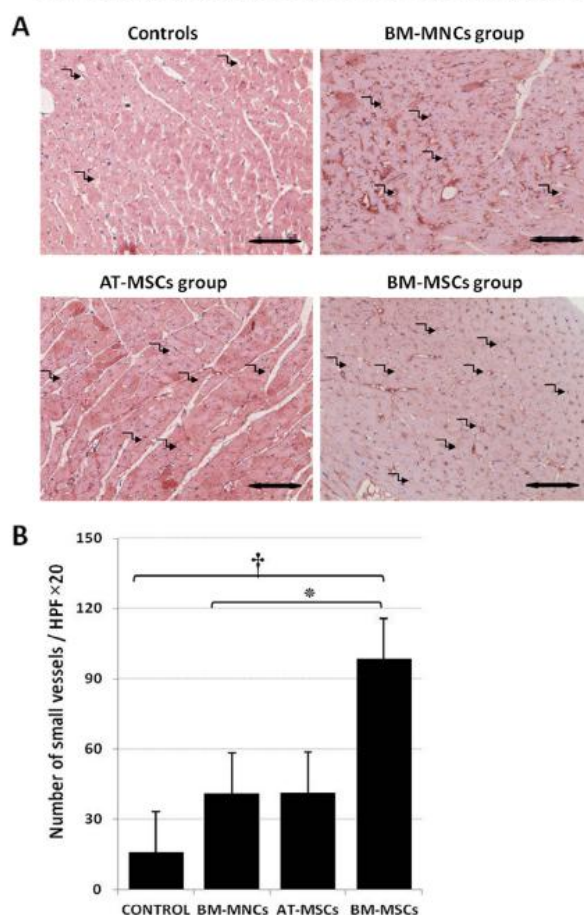


Figure 6. Immunohistochemical staining with α -SMA to quantify small vessels in the myocardium tissue. (A) Optical microscopy photomicrographs show representative myocardial samples stained with α -SMA. Magnification $\times 20$. Scale bars = 100 μ m. Arrows (\rightarrow) indicate α -SMA-positive stained vessels. (B) Quantitative analysis of small vessels in myocardium tissue: number of vessels in the myocardium tissue with a diameter ≤ 25 μ m per HPF $\times 20$. *Versus BM-MNC group: $P = 0.042$. †Versus control: $P = 0.008$.

higher than those receiving placebo, in spite of the fact that these two values do not reach statistical significance in this group when compared with their own pre-treatment values at day +42. Although there is little information in the literature about the behavior of intramyocardial AT-MSCs in DCM, Lin *et al.* [16] reported a 4.1% improvement in EF in comparison with controls although, as in our results, the difference with pre-treatment values was non-significant. Therefore, considered as a whole and summarizing the results from the comparisons baseline-versus-follow-up

and treatment-versus-controls at the end of the follow-up, we can conclude that BM-MSCs were able to improve every parameter of the cardiac function except those of diastolic dimensions over the baseline values and that this improvement provided significantly superior parameters of cardiac function in comparison with placebo, whereas the AT-MSC-treated group reached a more slight improvement in EF and FS that, although non-significant versus pre-treatment values, was superior to that found in controls and the BM-MNC group. In this sense, our results

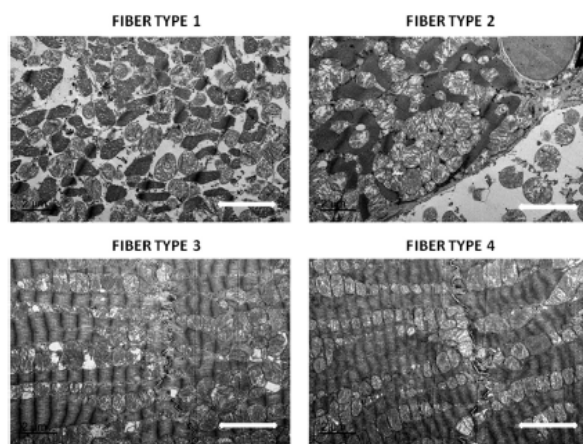


Figure 7. Transmission electron microscopy assessment of myocardium ultrastructure: photomicrographs from transmission electron microscopy: representative myocardial fiber types. Scale bars = 2 μ m.

corroborated those previously published for each individual type of cells, providing for the first time a direct comparison between the three cellular types studied.

The histological examination of hearts at day +70 showed differences between groups that are concordant with data of cardiac function: heart sections from BM-MSC-treated rats showed mainly normal cardiac fibers with central nuclei, well-developed myofibrils and well-organized transverse striation in strong contrast with the control group that exhibited mostly degenerative necrotic cardiac fibers; hearts from AT-MSC- and BM-MNC-treated animals showed an intermediate level of damage between that observed in controls and in animals treated with BM-MSCs. The ultrastructure, although limited by the low number of studied samples (three rats per group), seems to corroborate the histological findings, showing dramatic differences between controls and BM-MSC rats and intermediate grades of damage in the AT-MSC and BM-MNC groups.

Masson's Trichrome staining demonstrated that AT-MSC-treated animals had a percentage of collagen similar to controls, whereas those treated with BM-MNCs showed a significant reduction of fibrosis (0.33% versus 2.77% in controls), which was even more evident in those treated with BM-MSCs (0.009%). These results confirm previous studies demonstrating that both BM-MNC [31] and BM-MSC [12] transplantation can decrease myocardial collagen volume fraction through the attenuation of stress-generated over-expression of matrix metalloproteinases and provide direct evidence that BM-MSCs are superior to BM-MNCs in attenuating collagen deposition in ventricular remodeling.

Regarding the myocardial microvasculature, the number of small vessels per field was significantly higher in the hearts of animals treated with MSCs than in those treated with BM-MNCs and controls. Several studies have demonstrated that intramyocardial microvasculature (vessels ≤ 200 μ m in diameter that are directly responsible for tissue blood supply) is reduced in patients with DCM in comparison with healthy individuals [32]; in spite of this fact, there is a significant increase in the number of circulating CD34+ cells and endothelial progenitor cells associated with elevated levels of serum VEGF in such patients in the early stages of DCM that decrease as heart failure worsens [33]. Moreover, a direct association between myocardial perfusion and poor prognosis in DCM has been clearly established [34]. In this scenario we can argue that MSC-induced improvement in myocardial vasculature could contribute, at least in part, to the superior recovery of ventricular function observed in this group of animals. Interestingly, although the injection of BM-MNCs in our study caused a significantly higher peak in VEGF serum concentration at the first 24 h, the injection of BM-MSCs but not BM-MNCs caused a maintained increase in the levels of serum VEGF at least during the 4 weeks after cell injection (until the sacrifice on day +70) that, in turn, most likely contributes to the higher increase in the number of micro-vessels observed in this group of animals. On the other hand, BM-MSCs have been previously shown to express von Willebrand factor and smooth muscle actin after IMI and directly participate in vessel wall formation in rats with DCM [12].

Comparison of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs in rat dilated cardiomyopathy 959

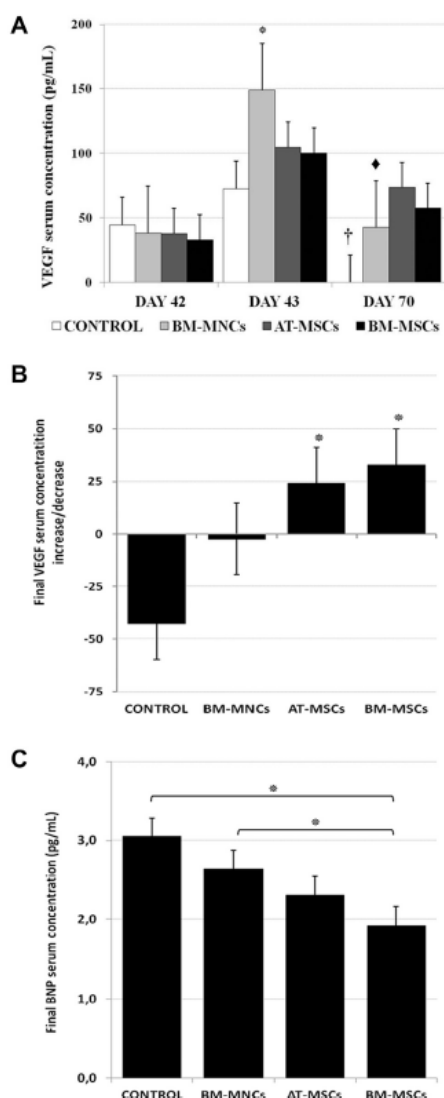


Figure 8. Quantification of VEGF-A and BNP in rat's serum. (A) VEGF-A concentration (pg/mL) on day 42, day 43 and day 70 from each treated group. On day 43, *versus controls: $P = 0.001$; versus AT-MSC group: $P = 0.011$; versus BM-MSC group: $P = 0.010$. On day 70, †versus BM-MNC, AT-MSC and BM-MSC groups: $P < 0.0001$, *versus AT-MSC group: $P = 0.008$. (B) Final VEGF-A increase/decrease (pg/mL) with respect to pretreatment serum concentration on day 42. *Versus controls and BM-MNC group: $P \leq 0.0001$. (C) Quantification of final BNP (pg/mL) concentration in rat serum. *Versus controls and BM-MNC group: $P \leq 0.050$.

Several mechanisms of action have been proposed for the improvement of cardiac function after cellular therapy both in the ischemic and non-ischemic settings.

In particular, BM-MSCs have been shown to engraft in the myocardium of DCM rats after IMI, expressing cardiac markers such as desmin, cardiac troponin T and connexin-43 [12]. We have not explored this fact in the present work but there seems to exist the general agreement that this phenomenon, although clearly demonstrated, does not constitute the principal mechanism of action. Instead, the mechanism of action is most likely a combination of cytokine-mediated effects including angiogenesis, myogenesis as well as anti-apoptotic and antifibrotic effects. To clarify some of these mechanisms, transcriptomic profiling of MSCs in comparison with BM-derived progenitors has been studied by Roson-Burgo *et al.* [35]. According to their published results, MSCs up-regulate cytokine genes related to cell proliferation of smooth and cardiac muscle, ventricular morphogenesis, angiogenesis and inflammatory response more than BM-derived progenitors. Regarding the potential differences between BM-MSCs and AT-MSCs, both cells types showed similar expression of cytokines related to cell proliferation, chemotaxis and immune response, but cytokines related to angiogenesis are more highly expressed in BM-MSCs and those related to inflammatory response in AT-MSCs. Negative regulation of smooth muscle cell proliferation is performed by AT-MSCs but not by BM-MSCs. Therefore, different MSC types display different therapeutic potential [36]. In particular, in the context of cardiovascular repair, the array of potential therapeutic mechanisms offered by MSC secretome components spans tissue preservation (anti-apoptotic and pro-mitotic), neovascularization, anti-inflammatory responses (anti-fibrosis and suppression of inflammatory cells) and activation of endogenous progenitors and stem cells [37]. These publications corroborate the superiority of MSCs observed in our study results.

On the other hand, it is important to have in mind that the disease model that we and others [12] have used to mimic human DCM is mediated by an autoimmune injury [38] and MSCs (both AT- and BM-derived) have potent immunosuppressive effects that BM-MNCs lack.

Although by day +42 fibrosis is established, replacing the inflammatory infiltrate, a role played at least partially by immunosuppression could not be excluded, which hypothetically could give advantage to MSCs over BM-MNCs to improve cardiac injury [37,39–44]. Further studies are warranted to clarify this point.

We [6] and others [4,45] have reported improvement in LV function after intracoronary infusion of BM-MNCs in clinical trials. There is no clear explanation for the contradiction between the results of the

960 D. Carmona et al.

present study and those found in humans by ourselves among others. We can hypothesize that the difference in the route of administration (intracoronary versus intramyocardial) and the complexity of the pathogenesis of human DCM, which make it difficult to be mimicked by any animal model, could constitute a possible explanation.

Conclusion

In summary, the present work demonstrates that intramyocardial expanded MSCs derived from BM and AT have beneficial effect superior to BM-MNCs for improving cardiac function and neovascularization in a rat model of DCM. BM-MSCs have more anti-fibrotic and cardiac fiber remodeling capacity than the other cells types including AT-MSCs.

Acknowledgments

This study was supported by a program grant (no. PI0191-2010) from the Fundación Progreso y Salud, Junta de Andalucía, Spain. We thank the Cardiology Department of Reina Sofia University Hospital in Córdoba, Spain, for echocardiographic technical advice, Anatomy and Comparative Pathology of University of Córdoba, Spain, for learning and technical advice, and Central Service of Research Support of Córdoba University (SCAI), Spain, for electron microscopy technical support.

Disclosure of interests: The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies cited in this article.

References

- [1] Behbahan IS, Keating A, Gale RP. Bone marrow therapies for chronic heart disease. *Stem Cells* 2015;33:3212–27. doi:10.1002/stem.2080.
- [2] Broughton KM, Sussman MA. Empowering adult stem cells for myocardial regeneration V2.0: success in small steps. *Circ Res* 2016;118:867–80. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305227.
- [3] Zwetsloot PP, Vègh AM, Jansen of Lorkers SJ, van Hout GP, Currie GL, Sena ES, et al. Cardiac stem cell treatment in myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Circ Res* 2016;118:1223–32. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307676.
- [4] Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, et al. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1 year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009;2:417–23. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.855023.
- [5] Seth S, Bhargava B, Narang R, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. The ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial: a long-term follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:1643–54. doi:10.1016/j.jacc.2009.11.070.
- [6] Suárez de Lezo J, Herrera C, Romero M, Pan M, Suárez de Lezo J Jr, Carmona MD, et al. Functional improvement in patients with dilated cardiomyopathy after the intracoronary infusion of autologous bone marrow mononuclear cells. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2013;66:450–7. doi:10.1016/j.rec.2012.11.013.
- [7] Martino H, Brofman P, Greco O, Bueno R, Bodanese L, Clausell N, et al. Multicentre, randomized, double-blind trial of intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell injection in non-ischaemic dilated cardiomyopathy (the dilated cardiomyopathy arm of the MiHeart study). *Eur Heart J* 2015;36:2898–904. doi:10.1093/eurheartj/ehv477.
- [8] Hamshire S, Arnous S, Choudhury T, Hamshire S, Arnous S, Choudhury T, et al. Randomized trial of combination cytokine and adult autologous bone marrow progenitor cell administration in patients with non-ischaemic dilated cardiomyopathy: the REGENERATE-DCM clinical trial. *Eur Heart J* 2015;36:3061–9. doi:10.1093/eurheartj/ehv390.
- [9] Sun C, Chang L, Sheu J, Chiang C, Lee F, Wu C, et al. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy alleviates left ventricular remodeling and improves heart function in rat-dilated cardiomyopathy. *Crit Care Med* 2009;37:1197–205. doi:10.1097/CCM.0b013e31819c0667.
- [10] Chin SP, Poey AC, Wong CY, Chang SK, Tan CS, Ng MT, et al. Intramyocardial and intracoronary autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in chronic severe dilated cardiomyopathy. *Cytotherapy* 2011;13:814–21. doi:10.3109/14653249.2011.574118.
- [11] Mushtaq M, DiFede DL, Golpanian S, Khan A, Gomes SA, Mendizabal A, et al. Rationale and Design of the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis in Dilated Cardiomyopathy (The POSEIDON-DCM Study): a phase I/II, randomized pilot study of the comparative safety and efficacy of transcatheter injection of autologous mesenchymal stem cell vs. allogeneic mesenchymal stem cells in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res* 2014;9:769–80. doi:10.1007/s12265-014-9594-0.
- [12] Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:1128–35. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500447.
- [13] Chen Y, Liu W, Li W, Gao W. Autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation improves left ventricular function in a rabbit model of dilated cardiomyopathy. *Exp Mol Pathol* 2010;88:311–15. doi:10.1016/j.yexmp.2009.12.002.
- [14] Sirui Yang S, Piao J, Jin L, Zhou Y. Does pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells with 5-azacytidine or double intravenous infusion improve their therapeutic potential for dilated cardiomyopathy? *Med Sci Monit Basic Res* 2013;19:20–31. PMID: PMC3638670.
- [15] Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu H. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J Cardiol* 2015;7:454–65. doi:10.4330/wjc.v7.i8.454.
- [16] Lin Y, Leu S, Sun CK, Yen C, Kao Y, Chang L, et al. Early combined treatment with sildenafil and adipose-derived mesenchymal stem cells preserves heart function in rat dilated cardiomyopathy. *J Transl Med* 2015;7:268–88. doi:10.1186/1479-5876-8-88.
- [17] Mörschbacher PD, Alves Garcez TN, Paz AH, Magrisso AB, Mello HF, Rolim VM, et al. Treatment of dilated cardiomyopathy in rabbits with mesenchymal stem cell

Comparison of BM-MNCs, BM-MSCs and AT-MSCs in rat dilated cardiomyopathy 961

- transplantation and platelet-rich plasma. *Vet J* 2016;209:180–5. doi:10.1016/j.tvjl.2015.11.009.
- [18] Gho JM, Kummeling GJ, Koudstaal S, Jansen Of Lorkeers SJ, Doeveendans PA, Asselbergs FW, et al. Cell therapy, a novel remedy for dilated cardiomyopathy? A systematic review. *J Card Fail* 2013;19:494–502. doi:10.1016/j.cardfail.2013.05.006.
 - [19] Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;57:250–62. PMID 2208806.
 - [20] Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K, et al. Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res* 1994;75:278–84. PMID 8033341.
 - [21] Watanabe K, Ohta Y, Nakazawa M, Higuchi H, Hasegawa G, Naito M, et al. Low dose carvedilol inhibits progression of heart failure in rats with dilated cardiomyopathy. *Br J Pharmacol* 2000;130:1489–95. PMID 10928949.
 - [22] Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001;19:219–25. doi:10.1634/stemcells.19-3-219.
 - [23] Ridzuan N, Al Abbar A, Yip WK, Maqbool M, Ramasamy R. Characterization and expression of senescence marker in prolonged passages of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* 2016;2016:8487264. doi:10.1155/2016/8487264.
 - [24] Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, et al. IFATS collection: the conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem Cells* 2009;27:478–88. doi:10.1634/stemcells.2008-0333.
 - [25] Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, Spinale FG, Francis GS, Prabhu SD, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res* 2012;111:131–50. doi:10.1161/RES.0b013e3182582523.
 - [26] Yang S, Piao J, Jin L, Zhou Y. Does pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells with 5-azacytidine or double intravenous infusion improve their therapeutic potential for dilated cardiomyopathy? *Med Sci Monit Basic Res* 2013;19:20–31. PMID: PMC3638670.
 - [27] Li L, Xia Y. Study of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplantation for rats with dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2014;20:398–406. PMID 24492176.
 - [28] Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:289–300. doi:10.1097/MNH.0b013e3283521cfa.
 - [29] Busuioc CJ, Popescu FC, Mogoşanu GD, Lascăr I, Pirici I, Pop OT, et al. Angiogenesis assessment in experimental third degree skin burns: a histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52:887–95. PMID 21892535.
 - [30] Ishida M, Tomita S, Nakatani T, Fukuhara S, Hamamoto M, Nagaya N, et al. Bone marrow-mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:436–45. doi:10.1016/S1053-2498(03)0020-1.
 - [31] Jin B, Luo XP, Ni HC, Li Y, Shi HM. Cardiac matrix remodeling following intracoronary cell transplantation in dilated cardiomyopathic rabbits. *Mol Biol Rep* 2010;6:3037–42. doi:10.1007/s11033-009-9874-y.
 - [32] Roura S, Planas F, Prat-Vidal C, Leta R, Soler-Botija C, Carreras F, et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy exhibits defective vascularization and vessel formation. *Eur J Heart Fail* 2007;10:995–1002. doi:10.1016/j.ejheart.2007.07.008.
 - [33] Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004;110:1209–12. doi:10.1161/01.CIR.0000136813.89036.21.
 - [34] Neglia D, Michelassi C, Trivieri MG, Sambucetti G, Giorgetti A, Pratali L, et al. Prognostic role of myocardial blood flow impairment in idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002;105:186–93. PMID 11790699.
 - [35] Roson-Burgo B, Sanchez-Guijo F, Del Cañizo C, De Las Rivas J. Insights into the human mesenchymal stromal/stem cell identity through integrative transcriptomic profiling. *BMC Genomics* 2016;17:944. doi:10.1186/s12864-016-3230-0.
 - [36] Bortolotti F, Ukovich L, Razban V, Martinelli V, Ruozzi G, Pelos B, et al. *In vivo* therapeutic potential of mesenchymal stromal cells depends on the source and the isolation procedure. *Stem Cell Reports* 2015;332–9. doi:10.1016/j.stemcr.
 - [37] Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 2012;244–58. doi:10.1016/j.stem.2012.02.005.
 - [38] Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Zhang SS, Hanawa H, Itoh E, et al. Characteristics of giant cells and factors related to the formation of giant cells in myocarditis. *Circ Res* 1991;69:1042–50. PMID 1934332.
 - [39] Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res* 2015;1413–30. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614.
 - [40] Wang M, Zhang G, Wang Y, Liu T, Zhang Y, An Y, et al. Crosstalk of mesenchymal stem cells and macrophages promotes cardiac muscle repair. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;53–61. doi:10.1016/j.biocel.2014.11.003.
 - [41] Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015). *Stem Cell Res Ther* 2016;7:82. doi:10.1186/s13287-016-0341-0.
 - [42] Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med* 2013;455–63. doi:10.5966/sctm.2012-0184.
 - [43] Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol* 2015;6:560. doi:10.3389/fimmu.2015.00560.
 - [44] Russell KA, Chow NH, Dukoff D, Gibson TW, LaMarre J, Betts DH, et al. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE* 2016;11:e0167442. doi:10.1371/journal.pone.0167442.
 - [45] Seth S, Narang R, Bhargava B, Ray R, Mohanty S, Gulati G, et al. AIMS Cardiovascular Stem Cell Study Group. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2350–61. doi:10.1016/j.jacc.2006.07.057.